

CARMEM LÚCIA DE MELLO SARTORI CARDOSO DA ROCHA

DETECÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DE PRODUTOS QUÍMICOS
NO SISTEMA METH1 EM *Aspergillus nidulans*

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Genética da Univer-
sidade Federal do Paraná para obten-
ção do grau de Mestre em Genética.

Orientador: Dr. Newton Freire-Maia
Co-Orientador: Dr. João Lúcio de Azevedo

CURITIBA

1983

Ao Dr. Newton Freire-Maia,
há quatorze anos meu mito,
meu orientador e meu amigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente a todos os que colaboraram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao Dr. João Lúcio de Azevedo, idealizador e grande responsável pela materialização desse laboratório que hoje conclui o seu primeiro trabalho; professor dedicado e orientador-amigo cuja enorme capacidade de compreensão, orientação e ajuda tornaram este trabalho possível.

Ao Dr. Newton Freire-Maia, pelo exemplo, pelo carinho com que esteve presente em todas as etapas dessa trajetória, pelas lições de confiança, seriedade, dedicação, brilho e vigor de que são veículos sua vida e seu trabalho.

À Profa. Eleidi Alice Chautard-Freire-Maia, pelo incentivo permanente.

Ao Prof. Bento Arce-Gomez, grande amigo.

A meus pais, Hildebrando e Norma, cuja dedicação sem limites me permitiu realizar esse sonho.

A meus avós, Rubens e Belmira, que tornaram possível grande parte dessa trajetória.

A meus sogros, Manuel e Helda, braços fortes nessa luta.

Ao Jorge que me sustentou o ânimo nos momentos mais difíceis dessa caminhada, e a quem eu devo, sem dúvida, a concretização deste trabalho.

À Profa. Ana Lígia de Paula Ramos, pela valiosa colaboração, além da integerrimina.

Ao Prof. Juarez Gabardo, pela orientação na análise estatística do trabalho.

A todos os professores e colegas do Departamento de Genética da UFPR, pela amizade, encorajamento e ajuda.

A todo o pessoal do Laboratório de Genética da Universidade de Brasília, pela cooperação e carinho com que acompanharam parte do meu trabalho.

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS	vi
	LISTA DE FIGURAS	viii
1	<u>INTRODUÇÃO</u>	1
1.1	ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS	1
1.1.1	Histórico	1
1.1.2	Toxidez dos alcalóides pirrolizidínicos...	3
1.1.3	Bioquímica dos alcalóides pirrolizidínicos	11
1.1.3.1	Metabolismo	12
1.1.3.1.1	Hidrólise	12
1.1.3.1.2	Oxidação	14
1.1.3.1.3	Demetilação	
1.1.3.1.4	Desidrogenação a derivados pirrólicos ..	14
1.1.4	Ocorrência dos alcalóides pirrolizidínicos na natureza	16
1.1.5	Ecologia dos alcalóides	21
1.1.6	Efeitos patológicos dos alcalóides pirro- lizidínicos	23
1.1.7	Ação antimetabólica e antitumor	26
1.1.8	Efeitos mutagênicos e quebras cromossômi- cas	28
1.1.9	Ação sobre os ácidos nucleicos	30
1.2	INTEGERRIMINA	30
1.2.1	Histórico	30
1.2.2	Ocorrência na natureza	31
1.2.3	Bioquímica	33
1.2.4	Obtenção e purificação do alcalóide	33
1.3	SISTEMA METIONINA EM <i>A. NIDULANS</i>	37
1.3.1	Histórico	37
1.3.2	Bioquímica do sistema metionina	37
1.3.3	Genética do sistema metionina	39
1.4	OBJETIVOS	44

2	<u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	45
2.1	MATERIAL	45
2.1.1	Linhagem	45
2.1.2	Produtos químicos para teste de mutageni- cidade	45
2.1.3	Meios de cultura e soluções	46
2.2	METODOLOGIA	47
2.2.1	Tratamento	47
2.2.2	Semeadura e incubação	47
2.2.3	Contagem das colônias	49
2.2.4	Análise dos dados	50
3	<u>RESULTADOS</u>	51
4	<u>DISCUSSÃO</u>	58
5	<u>RESUMO E CONCLUSÕES</u>	69
6	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	71

LISTA DE TABELAS

1	Distribuição dos alcalóides pirrolizidínicos nos diferentes gêneros e famílias vegetais ..	18
2	Alcalóides de algumas plantas dos gêneros <i>Senecio</i> , <i>Ligularia</i> e <i>Heliotropium</i>	20
3	Plantas de onde se extraiu integerrimina	32
4	Seqüência de extração de alcalóides segundo a técnica de Novelli e Varela, com modificações de Motidome e Ferreira	36
5	Enfoque bioquímico dos genes do sistema metionina	40
6	Conteúdos dos tubos para tratamento	48
7	Efeitos mutagênicos de DES e integerrimina na reversão do caráter metionina da linhagem <u>biA1 methG1</u> de <i>Aspergillus nidulans</i>	52
8	Efeitos mutagênicos de DES e integerrimina na reversão do caráter metionina da linhagem <u>biA1 methG1</u> de <i>Aspergillus nidulans</i>	53
9	Efeitos mutagênicos de DES e integerrimina na reversão do caráter metionina da linhagem <u>biA1 methG1</u> de <i>Aspergillus nidulans</i>	54
10	Análise das diferenças na freqüência de mutação entre os grupos de revertentes, nos diversos tratamentos	55

11	Análise do aumento da frequência de mutação provocada pelo tratamento com DES e HCl	56
12	Análise do aumento da frequência de mutação provocada pelo tratamento com três concentra- ções de integerrimina	56
13	Análise do efeito de dose da integerrimina ..	56
14	Frequência de mutação espontânea e frequência relativa dos três tipos de mutantes para o sistema metionina, com linhagem <u>biA1</u> <u>methG1</u> .	64

LISTA DE FIGURAS

1	Características estruturais requeridas para toxidez dos alcalóides pirrolizidínicos	6
2	Estrutura química dos alcalóides pirrolizidínicos	6
3	Estrutura química do anel pirrolizidina; 7-hidroxi-1-hidroximetil pirrolizidina; 1,2 desidroderivados	13
4	Fórmulas estruturais dos alcalóides das variedades brasileiras de <i>Senecio brasiliensis</i>	13
5	N-oxidação de um alcalóide pirrolizidínico ..	15
6	Desidrogenação de um alcalóide pirrolizidínico insaturado	15
7	Alquilação de uma amina por um éster desidropirrolizidínico reativo	17
8	Alquilação de um grupo nucleofílico (Y^-) por um éster reativo desidropirrolizidínico, em meio aquoso. Competição entre alquilação e hidrólise	17
9	Fórmulas estruturais e fórmulas moleculares dos alcalóides das variedades brasileiras de <i>Senecio brasiliensis</i> e de seus ácidos e bases	34

1 INTRODUÇÃO

1.1 ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS

1.1.1 Histórico

Um histórico do uso de plantas contendo alcalóides pirrolizidínicos foi feito por Klásek (1973). Segundo esse autor, o primeiro relato dessa utilização reporta a 371-286 aC, quando Theophrastos mencionou, pela primeira vez, as plantas do gênero *Senecio*, indicando suas poções para problemas gástricos e supuração de feridas. Galenus (200 aC) e Plinius (23-79 dC) também relataram o poder curativo de *Senecio vulgaris*, cujo extrato tinha poder benéfico sobre doenças hepáticas e disfunções gástricas, cálculos renais e icterícia.

No século X, as propriedades curativas do gênero *Senecio* foram mencionadas na coletânea de trabalhos "Macer floridus". Draggendorff, em 1898, descreveu a utilização de cerca de vinte espécies de *Senecio* em medicina, relatando também os efeitos tetânicos causados por uma substância venenosa contida nessas plantas.

Embora em 1542 Fuchs tivesse tentado realizar um estudo químico de *Senecio fuchsii*, apenas em 1867 foi publicado o primeiro trabalho científico sobre a farmacologia de *Senecio canadensis*, de origem mexicana, referindo-se

à presença de alcalóides nessas plantas, então utilizadas como veneno para ratos e cães, havendo ocorrências de intoxicação voluntária no homem.

A primeira extração desses alcalóides foi feita a partir de *Senecio vulgaris*, em 1895, por Grandval e Lajoux — a senecionina e a senecina (Moraes, 1952). Posteriormente, eles eram obtidos por Dalche e Heim, para aplicação em ginecologia (Dalche & Heim, 1897). Segundo eles, altas doses desses alcalóides tinham efeito hemostático, enquanto pequenas doses tinham efeito contrário. Por volta de 1900, esses alcalóides eram encontrados comercialmente para uso em ginecologia. Grandval e Lajoux publicaram uma descrição pormenorizada desse processo de isolamento acima referido, por ocasião da determinação da fórmula empírica da senecionina.

Em 1909, dois novos alcalóides foram extraídos de *Senecio latifolius* e o processo de hidrólise da senecifolina foi descrito pela primeira vez. Mais tarde, Müller isolou e estudou as propriedades farmacológicas de mais dois alcalóides, a silvasenecina e a fuchsisenecionina. Eles são encontrados nas respectivas plantas sob a forma de tartaratos e succinatos, e o seu extrato tem um efeito curare sobre o sistema nervoso periférico, descrito anteriormente por outros autores. As bases sem purificação têm um efeito supressor central, sem causar dano algum ao coração, e os alcalóides puros são biologicamente inativos.

1.1.2 Toxidez dos alcalóides pirrolizidínicos

Apesar das propaladas propriedades curativas dos alcalóides pirrolizidínicos, há muito reconheceu-se serem eles toxinas naturais importantes na etiologia de doenças e mortes tanto do homem como de animais no mundo todo. Assim, a "walking disease" nos Estados Unidos, "walkabout" na Austrália, "pictou disease" no Canadá, "winton disease" em Nova Zelândia, "molteno staggers", "dunsiekte", "stywesiekte" e "jaagsiekte" na África do Sul, e "suiljuk disease" na Ásia Central são diferentes denominações de um mesmo problema: intoxicação por ingestão de plantas dos gêneros *Senecio*, *Heliotropium*, *Amsinckia*, *Crotalaria* etc. (Hill, 1960; Rose, 1972). E, apesar de apenas em 1903 Gilruth ter demonstrado relação entre "winton disease" e *Senecio jacobaea*, já no final do século passado atribuíam-se diversas dessas manifestações às plantas do gênero *Senecio* (Rose, 1972).

Excluindo as regiões onde essas plantas são usadas em medicina popular ou na alimentação, os mais atingidos por esse tipo de intoxicação são os animais, principalmente os de pastagem. É sabido que os animais se recusam a comer alimentos contaminados com plantas tóxicas, mas há os que as ingerem com facilidade, principalmente se forem recém-colhidas (Moraes, 1952). Nas pastagens escassas, nas regiões áridas ou na seca de inverno, pode ocorrer a ingestão dessas plantas, o que não aconteceria em condições de pasto abundante.

Há também a possibilidade de serem esses animais contaminados naturalmente, por administração de ração à base de forrageiras que foram colhidas juntamente com essas plantas

quando pouco desenvolvidas (Mc Lean, 1970).

No homem, a intoxicação pode ocorrer por uso deliberado ou acidental de vegetais contendo alcalóides pirrolizidínicos. No primeiro caso, temos o exemplo de certos países onde cerca de quinze espécies de *Senecio* são usadas como alimento, sete como rapê, uma como cigarro e muitas outras para inalação (Rose, 1972). Além do habitual "bush tea" e dos banhos para dar boa sorte, há o uso de diversas preparações, como infusões, decocções, enemas, chás e cataplasmas, com fins medicamentosos. A partir de *Senecio*, obtêm-se purgativos, remédios para hemoptise e diversas doenças da infância (Rose, 1972). *Crotalaria* é indicada para impetigo, escabiose, distúrbios gástricos, como laxativos, emenagogos (Chopra, 1933, *apud* Schoental & Head, 1955); ou para malária, disenteria, antrás, hidropsia e tosse crônica (Watt & Breyer Brandwijk, 1932, *apud* Schoental & Head, 1955). Pode haver ainda intoxicação acidental do homem, como relata Willmot, na África do Sul, e Cushny, no Canadá, pela ingestão de farinha contaminada com sementes dessas plantas (Klásek, 1973) ou de outros cereais nas mesmas condições (Mc Lean, 1970).

Albertyn, em 1918, foi o primeiro a relatar a ocorrência de uma doença entre seres humanos, chamada "envenenamento por pão", que consistia basicamente em lesões hepáticas semelhantes às citadas para animais (Moraes, 1952). A população pobre, cuja alimentação era basicamente pão, era a mais afetada. A partir dessa constatação, Willmot e Robertson concluíram que deveria estar havendo contaminação do trigo por *Senecio burchelli* e *Senecio ilicifolius*, abundan-

tes nos trigais (Moraes, 1952). Essa doença, descrita na África do Sul, também foi referida na Jamaica e no Egito (Ramos, 1977).

Os seis alcalóides pirrolizidínicos encontrados em *Senecio jacobaea* foram detectados no mel produzido a partir do néctar dessa espécie (Deinzer *et al.*, 1977).

Schoental demonstrou que ratas que ingeriam alcalóides pirrolizidínicos os transmitiam aos seus filhos através do leite, causando-lhes danos no fígado. Isso nos mostra a possibilidade de ingerirmos esses alcalóides através do leite de animais que se tenham alimentado de plantas que os contêm (Mattocks, 1972).

As características estruturais requeridas para a ocorrência de toxidez são: esterificação de pelo menos um grupo hidroxil e dupla ligação na posição 1-2 do anel pirrolizidina (Fig. 1). Há relação quantitativa entre toxidez, de um lado, e o número e a natureza da esterificação do grupo hidroxil, de outro, bem como com respeito à estereoquímica da fração ácida ou básica. Assim, a esterificação de dois grupos hidroxil, formando diésteres, e principalmente quando estes são cíclicos, como a retrorsina, a integerrimina e a senecionina, alcalóides da espécie brasileira de *Senecio*, causa maior toxidez (Fig. 2).

Sua toxidez está ligada preferencialmente à conversão dos alcalóides em metabólitos pirrólicos pelos microsossomos hepáticos.

Mattocks (1972) enumera seis razões para que se conclua isso:

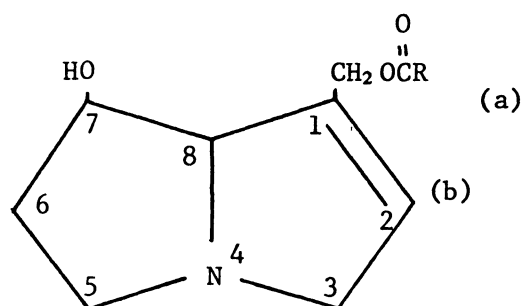


Fig. 1. Características estruturais requeridas para toxidez dos alcalóides pirrolizidínicos: a) esterificação de pelo menos um grupo hidroxil; b) dupla ligação na posição 1-2 do anel pirrolizidina (Mattocks, 1972).

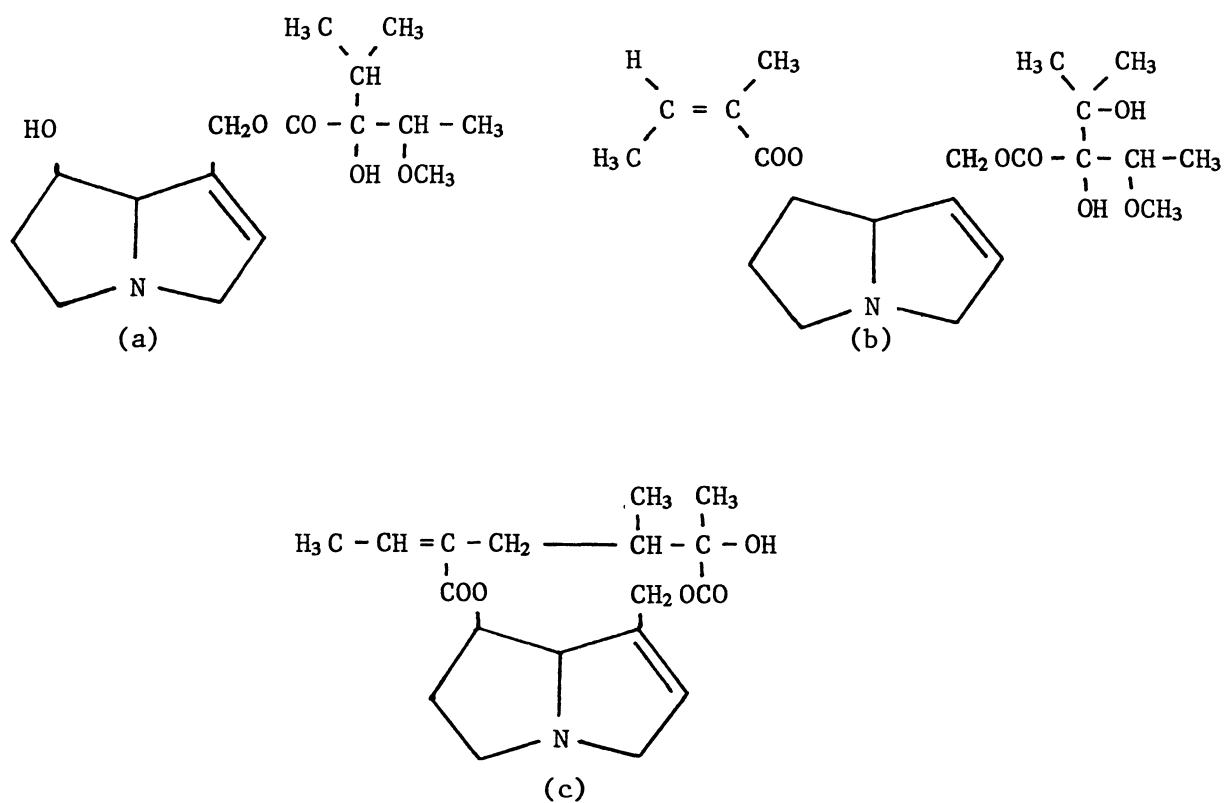


Fig. 2. Estrutura química dos alcalóides pirrolizidínicos: (a) monoéster (heliotrina); (b) diéster (lasiocarpina); (c) diéster cíclico (platifilina) (Mattocks, 1972).

1. Os maiores efeitos tóxicos ocorrem em certos órgãos, independentemente da forma de administração do alcalóide. Não aparecem danos citológicos (citotoxicidade) nos locais de injeção da droga.

2. A aplicação direta na pele não causa qualquer efeito local (Schoental *et al.*, 1954, *apud* Mattocks, 1972), o que não ocorre com a aplicação dos metabólitos pirrólicos.

3. O alcalóide não é tóxico para certos organismos, como a mariposa, embora ela se alimente de plantas contendo esses alcalóides, acumulando-os no corpo em quantidades relativamente grandes.

4. A toxicidade crônica devida a uma única dose de retrorsina, dada a ratos com menos de uma hora de nascidos, é muito menor que a que ocorre quando os ratos têm mais de um dia, pois as enzimas do fígado, que metabolizam drogas, em ratos recém-nascidos têm menor atividade para retrorsina; essa atividade, porém, cresce consideravelmente durante os primeiros dias de vida.

Muitos estudos têm sido realizados no sentido de avaliar o efeito das enzimas hepáticas sobre a metabolização de alcalóides pirrolizidínicos. Há dados surpreendentes da ação dos próprios alcalóides sobre os níveis de atividade dessas enzimas no fígado. Jacobina e monocrotalina foram testadas em ratos e apresentaram resultados distintos: a jacobina promoveu um aumento significativo na atividade da epoxide hidrase e glutathione S-transferase, reduzindo, no entanto, o conteúdo de citocromo P-450 e as atividades rela-

cionadas à monooxigenase. A monocrotalina não estimulou a epoxide hidrase, enquanto diminuiu a atividade da glutathion S-transferase, da aminopirina dimetilase e da AHH (Miranda *et al.*, 1980a). Nesse mesmo trabalho, testaram a ação desses alcalóides sobre as mesmas enzimas *in vitro*; houve apenas ligeira estimulação da epoxide hidrase por ambos os alcalóides e uma pequena redução da atividade da aminopirina dimetilase pela monocrotalina.

Esses mesmos autores, num outro experimento, ministraram uma dieta com 5% de *Senecio jacobaea* por um período de uma a quatro semanas. Ocorreu um aumento de cinco a seis vezes na atividade da epoxide hidrase e significativo aumento na atividade da glutathion S-transferase. Se, em vez da planta, era ministrada, na dieta, 0,5% de uma mistura dos alcalóides extraídos dessa planta, observava-se o mesmo aumento de cinco vezes na atividade da epoxide hidrase e de 75% na de glutathion S-transferase. Já a aril hidroxilase hidrocarbônica (AHH) foi reduzida significativamente pela ingestão de 5% da planta ou 0,5% da mistura de alcalóides. O conteúdo de citocromo P-450 microsomal hepático diminuiu com 0,5% da mistura de alcalóides, mas não com 5% da planta (Miranda *et al.*, 1980b).

Outros autores, testando quatro plantas diferentes, observaram o aumento de atividade da glutathion S-transferase e epoxide hidrase, bem como dos níveis de cobre hepático (Garret *et al.*, 1982). A partir deste dado, num outro experimento, forneceram a alguns ratos, juntamente com a dieta, 5% de *Senecio jacobaea* e 50 g de cobre na forma de CuSO_4 . A hepatotoxicidade foi avaliada pela atividade da as-

partato aminotransferase (AST) do plasma, alanina amino transferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP). Apenas com 5% da planta, os aumentos foram de 122% para AST, 106% para ALP e 152% para ALT. No grupo que recebeu a planta e o cobre, o aumento foi razoável para ALP e da ordem de 350% para AST e ALT (Miranda *et al.*, 1981).

Mattocks (1972) relatou que a estimulação das enzimas que metabolizam drogas, com fenobarbitone, reduz a 1/4 a dose letal (LD₅₀) de retrorsina, para cobaias.

Johnson (1982) observou, em vacas, a ação da ingestão de *Senecio jacobaea* sobre os níveis de atividade das enzimas do soro, sinais clínicos, tempo de sobrevivência e de exame histopatológico do tecido hepático. Testou as possíveis alterações nesses parâmetros, pela adição de vitaminas e minerais. Ambos se mostraram ineficazes na proteção dos animais relativamente a quaisquer dos sinais.

Miranda *et al.* (1982), no entanto, trabalhando com ratos chegaram a dois resultados positivos na prevenção dos efeitos tóxicos de *Senecio jacobaea*: 0,75% de BHA (butylated hidroxyanisole) na dieta por dez dias antes e quatorze dias depois da injeção de alcalóides pirrolizidínicos extraídos da planta (160 mg/kg de peso corporal) reduziu o quadro. Em alguns casos, chegou a prevenir completamente qualquer sinal (fibrose, hiperplasia biliar, megalocitose, necrose e calcificação do fígado) que ocorria oito semanas após a injeção, no grupo sem BHA. A cisteína, entretanto, testada da mesma forma, só foi capaz de diminuir a gravidade das lesões hepáticas. Kim e Jones (1982) também obtiveram efeitos protetores do BHA, EQ (ethoxyquim) e DSF (disulfi-

ram). A administração dessas substâncias durante sete dias na dieta de camundongos reduziu a toxicidade dos alcalóides pirrolizidínicos extraídos de *Senecio longilobus*.

5. Algumas espécies de animais são mais resistentes aos danos no fígado, que outras. Enquanto ratos morrem com uma dose de 40 mg/kg de peso corporal de retrorsina, cobaias não apresentam danos hepáticos com até 420 mg/kg de peso, sobrevivendo até 800 mg/kg de peso. Goeger *et al.* (1981), testando a toxicidade de *Senecio jacobaea*, observaram que cabras são mais resistentes à seneciose que cavalos e bois.

6. Os alcalóides são, por si mesmos, muito pouco reativos. Não se conhecem reações *in vivo* a não ser a conversão a derivados pirrólicos, que os tornem reativos.

7. Compostos químicos semelhantes aos metabólitos dos alcalóides tóxicos, quando administrados a ratos, mostram os mesmos efeitos mas com menor intensidade.

Mattocks (1972) ainda concluiu que as variações de toxicidade dos alcalóides naturais são provavelmente devidas mais aos vários graus de metabolização deles pelo organismo, do que pelas diferenças entre os metabólitos.

Com todos esses elementos, parece-nos haver basicamente dois níveis de ação dos alcalóides pirrolizidínicos no organismo:

1. a sensibilização do mesmo, através do incremento da atividade das enzimas encarregadas da metabolização de drogas;

2. a intoxicação real sobre os conteúdos celulares, pelos derivados obtidos pela ação dessas mesmas enzimas. Daí se conclui que diferenças entre espécies de animais ou entre populações de uma mesma espécie na capacidade de sintetizar essas enzimas podem levar a diferenças na ação desses alcalóides.

Outro aspecto a considerar é que cada alcalóide tem um efeito dentro da célula: alguns não são tóxicos, enquanto que outros o são em diversos graus e atuam sobre diferentes enzimas. Quando a planta que contém mais de um alcalóide é ingerida, pode haver complementação no processo de intoxicação, com cada um desempenhando uma função específica. Seguindo esse raciocínio, certas plantas poderiam ser tóxicas não pelos alcalóides que contenham. Estes seriam responsáveis apenas por incrementar a metabolização de outros compostos, estes, sim, tóxicos para o organismo. Um alcalóide pode, pois, mostrar-se inócuo ao ser testado isoladamente e ter o papel principal na toxidez da planta.

1.1.3 Bioquímica dos alcalóides pirrolizidínicos

Todos os alcalóides do gênero *Senecio* caracterizam-se pelo núcleo heterocíclico pirrolizidina contendo um átomo de nitrogênio (Fig. 3), donde o nome alcalóides pirrolizidínicos. São, na maioria, ésteres de aminoálcoois derivados de 1 metil-pirrolizidina com diferentes ácidos orgânicos, contendo cinco ou dez átomos de carbono. Embora o número total de carbonos na molécula seja variável, predominam os alca-

lóides com dezoito átomos de carbono. Em alguns outros gêneros, esse número é de seis, sete ou oito (Klásek, 1973). Os alcalóides em si podem ser monoésteres, diésteres ou diésteres cíclicos (Fig. 2), segundo Mattocks (1972), e podem ou não conter dupla ligação na posição 1-2 do anel pirrolizidina. Nas plantas do gênero *Senecio* há a presença característica de diésteres cíclicos constituídos pela base 7-hidrôxi-1-hidroxi-metil pirrolizidina (Fig. 3) ou seus 1,2 desidroderivados (Fig. 3) e por um ácido dicarboxílico, contendo dez átomos de carbono. Assim, no caso particular dos alcalóides das variedades brasileiras de *Senecio brasiliensis*, as fórmulas estruturais apresentam-se como na Fig. 4.

1.1.3.1 Metabolismo

1.1.3.1.1 Hidrólise

Os alcalóides pirrolizidínicos, sendo ésteres, fornecem por hidrólise alcalina uma base (alcanolamina) e um ácido. Essa base recebe o nome de necina e o ácido é chamado de ácido nécico. Alguns alcalóides de *Senecio* fornecem, por hidrólise, outros ácidos de estrutura simples e bem conhecida, como o ácido dl-lático, angélico, seneciólico. Como os diversos produtos de hidrólise estudados têm-se mostrado não tóxicos, Mattocks (1972) propôs ser esse um mecanismo de detoxicação.

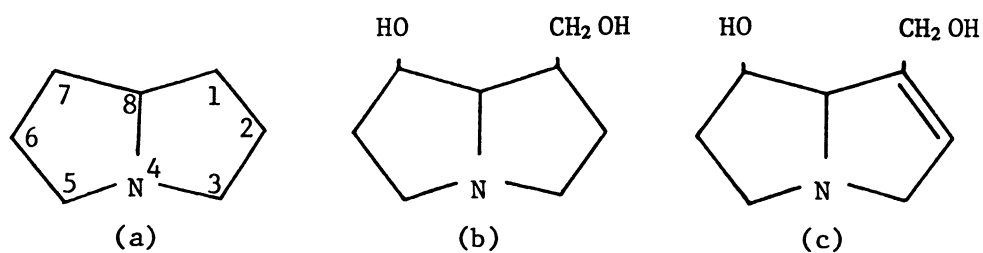


Fig. 3. (a) Estrutura química do anel pirrolizidina; (b) 7-hidroxi-1-hidroximetil pirrolizidina; (c) 1,2 desidroderivados (Klášek, 1973).

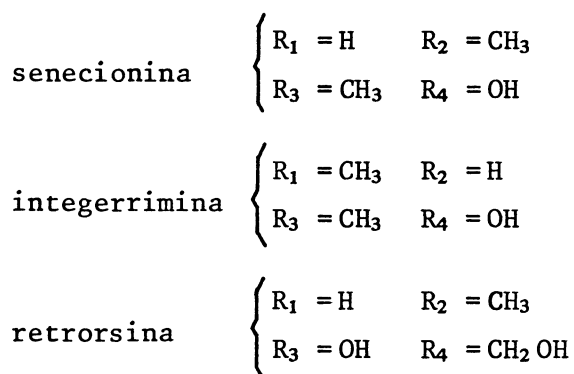
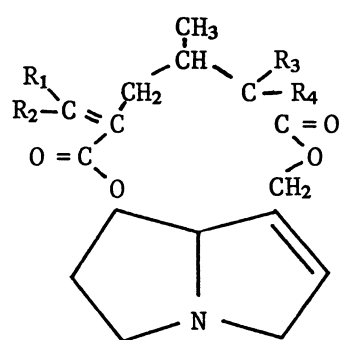


Fig. 4. Fórmulas estruturais dos alcalóides das variedades brasileiras de *Senecio brasiliensis* (Klášek, 1973).

1.1.3.1.2 Oxidação

Os alcalóides são facilmente convertidos a seus N-óxidos e a reação é rapidamente reversível por agentes redutores (Fig. 5).

Os derivados N-óxidos já foram apontados como os responsáveis por toxicidade dos alcalóides pirrolizidínicos, mas, no presente, são reconhecidamente não tóxicos, podendo ser considerados como produto de detoxicação.

1.1.3.1.3 Demetilação

Em carneiros foi descrito um processo de detoxicação que consiste, numa primeira etapa, na demetilação de um grupo metoxi do alcalóide. Esse produto é menos tóxico que o alcalóide. No rúmen, entretanto, ainda ocorre um segundo processo metabólico de detoxicação mais eficiente: a conversão do alcalóide em duas bases não tóxicas (Mattocks, 1972).

1.1.3.1.4 Desidrogenação a derivados pirrólicos

Essa reação é catalisada por oxidases microsossomais hepáticas. Esses derivados são altamente reativos, sendo hoje considerados os maiores responsáveis pela toxicidade e efeitos antimitóticos e mutagênicos dos alcalóides pirrolizidínicos (Fig. 6).

De acordo com Mattocks (1972), os derivados pirrólicos são quimicamente ésteres desidropirrolizidínicos. Neles os grupos éster são "ativados" por conjugação com nitrogênio. O grupo éster pode então, rapidamente, ser perdido, deixan-

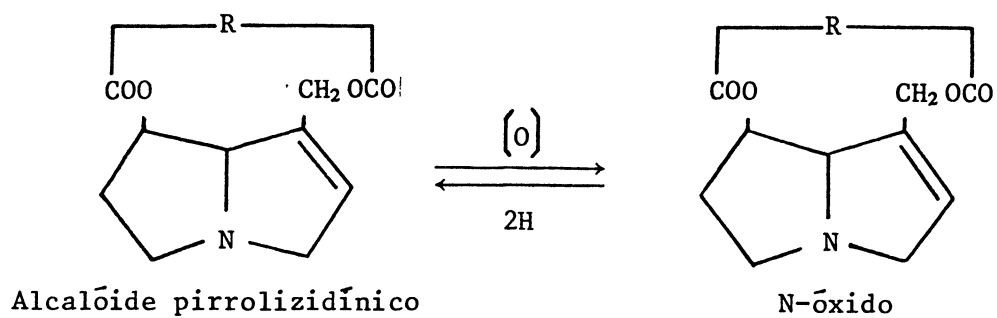


Fig. 5. N-oxidação de um alcalóide pirrolizidínico (Mattocks, 1972).

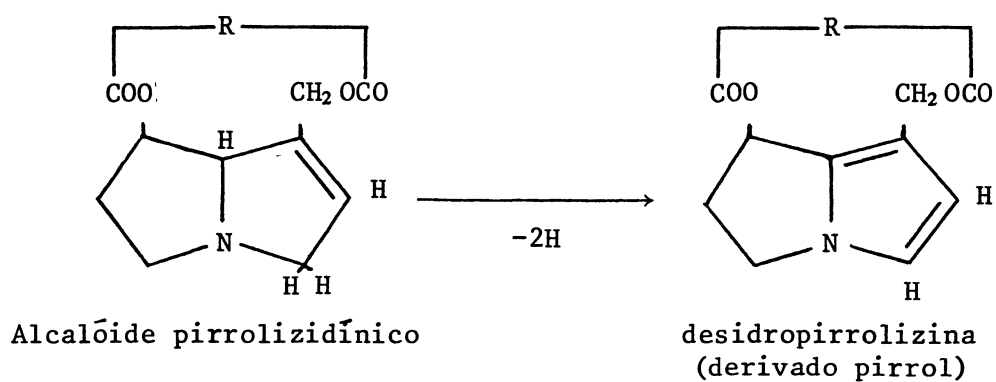


Fig. 6. Desidrogenação de um alcalóide pirrolizidínico insaturado (Mattocks, 1972).

do a fração desidropirrolizidina positivamente carregada, a qual pode reagir com grupos negativamente carregados (nucleofílicos) como as aminas ou tióis, formando produtos de alquilação relativamente estáveis (Fig. 7).

Os ésteres pirrólicos, devido à extrema reatividade, podem ser rapidamente hidrolisados. Assim, quando num meio aquoso como, por exemplo, a célula viva, contendo grupos nucleofílicos (Y^-), há competição entre as reações de hidrólise e alquilação (Mattocks, 1969) (Fig. 8).

1.1.4 Ocorrência dos alcalóides pirrolizidínicos na natureza

Embora os alcalóides pirrolizidínicos sejam também chamados alcalóides de *Senecio*, em virtude de terem sido isolados a partir de plantas desse gênero, eles ocorrem em muitos gêneros e até famílias, conforme mostra a Tabela 1. Eles estão espalhados pelo mundo todo. No Brasil, há cerca de 128 espécies de *Senecio*, distribuídas principalmente na região centro-sul. A mais comum é *Senecio brasiliensis* Less., popularmente chamada tasneirinha, catião, flor-das-almas, flor-de-finados, cardo-morto, cravo-do-campo ou maria-mole. É constituída por três variedades, duas das quais são brasileiras: *brasiliensis* e *tripartitus*. Essas variedades, tal como acontece com várias outras espécies de *Senecio*, são de difícil distinção botânica. O conteúdo alcaloídico, no entanto, apresenta diferença: seu alcalóide principal para a variedade *brasiliensis* é a senecionina e para a variedade *tripartitus* é a integerrimina. Esses alcalóides são isôme-

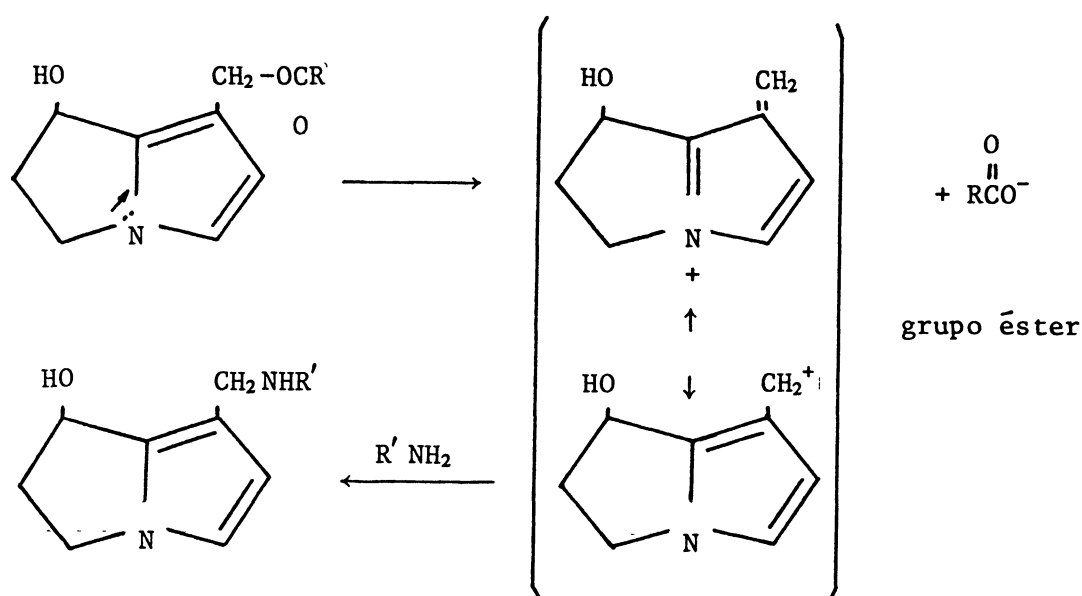


Fig. 7. Alquilação de uma amina por um éster desidropirrolizidínico reativo (Mattocks, 1972).

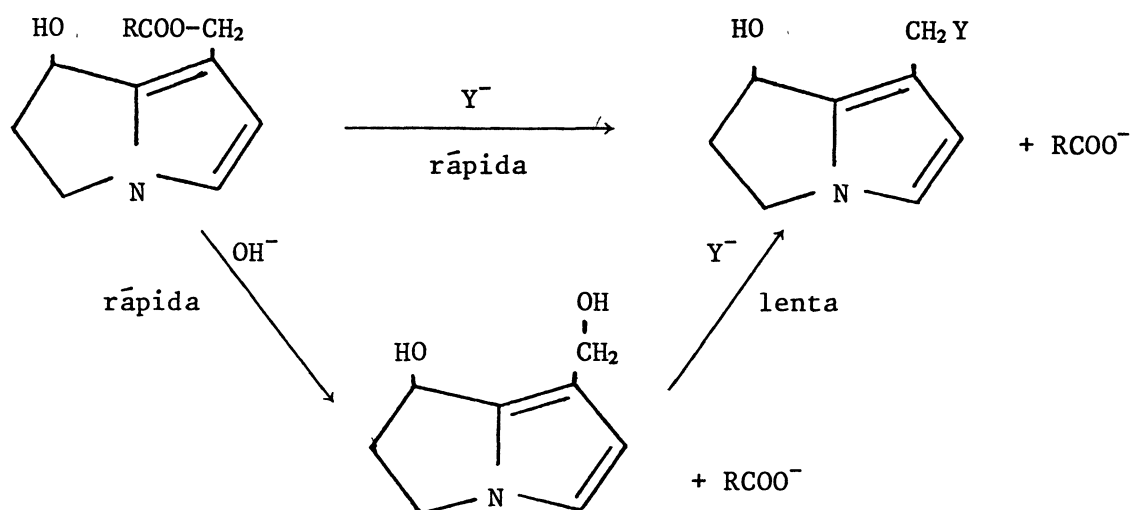


Fig. 8. Alquilação de um grupo nucleofílico (Y⁻) por um éster reativo desidropirrolizidínico, em meio aquoso. Competição entre alquilação e hidrólise (Mattocks, 1969).

Tabela 1. Distribuição dos alcalóides pirrolizidínicos nos diferentes gêneros e famílias vegetais (Klásek, 1973).

FAMÍLIA	GÊNERO
Apocynaceae	<i>Anodendron, Urechites.</i>
Compositae	<i>Cacalia, Erechites, Eupatorium, Ligularia, Nardosmia, Petasites, Senecio.</i>
Borraginaceae	<i>Amsinckia, Cynoglossum, Echium, Heliotropium, Lindefolia, Macrotomia, Rindera, Symphytum, Tournefortia, Trachelanthus, Trichodesma.</i>
Celastraceae	<i>Bhesa.</i>
Gramineae	<i>Festuca, Lolium, Thelepogon.</i>
Leguminosae	<i>Andenocarpus, Crotalaria, Cytisus.</i>
Orchidaceae	<i>Chysis, Kingiella, Malaxis, Phalaenopsis, Vanda.</i>
Rhizophoraceae	<i>Cassipourea.</i>
Santalaceae	<i>Thesium.</i>
Sapotaceae	<i>Planchonella.</i>

ros e estão acompanhados nas duas variedades pela retrorsina (Motidome & Ferreira, 1966). A Tabela 2 apresenta algumas espécies de plantas com seus respectivos alcalóides.

A quantidade de alcalóide varia de um órgão para outro da planta, embora em pequenas proporções. É significativa, no entanto, a variação do conteúdo alcaloídico nas diferentes fases do ciclo vegetativo (Motidome & Ferreira, 1966). Moraes (1952) obteve os seguintes resultados em relação à planta seca:

antes da floração	- 0,45%
durante a floração	- 0,29%
após a floração	- 0,15%

No entanto, a qualidade desses alcalóides não varia, ou seja, os mesmos alcalóides que caracterizam uma espécie ou até uma variedade botânica são encontrados em qualquer parte da planta, em qualquer época e em qualquer lugar onde esse vegetal for replantado (Motidome & Ferreira, 1966). Para esta última conclusão, Motidome e Ferreira transplantaram mudas da variedade *brasiliensis* do seu local de origem para regiões onde a variedade original era a *tripartitus*. Acompanharam o desenvolvimento da planta durante os duzentos dias de seu ciclo vegetativo, através de pesquisas periódicas sobre a natureza química de suas folhas.

Os alcalóides aparecem em grupos de dois ou mais em cada planta, havendo concentrações diferentes caracterizando um alcalóide principal e os secundários.

Tabela 2. Alcalóides de algumas plantas dos gêneros *Senecio*, *Ligularia* e *Heliotropium* (Klásek, 1973; Rose, 1972; Manske, 1939; Barger & Blackie, 1936; Reddy *et al.*, 1968; Sullman & Zuckerman, 1969; Asada *et al.*, 1981.

PLANTA	ALCALÓIDES
<i>S. erraticus</i>	Senecionina, integerrimina, senecifilina, otosenina, erucifolina.
<i>S. vulgaris</i>	Senecionina, senecifilina, retrorsina.
<i>S. erucifolius</i>	Senecionina, senecifilina, otosenina, erucifolina.
<i>S. viscosus</i>	Senecionina, integerrimina, alcalóide S-F.
<i>S. rivularis</i>	O ⁷ -angeloilheliotridina, amida C ₆ H ₁₁ NO.
<i>S. aegyptius</i>	Senecionina, otosenina, ridelina, erucifolina.
<i>S. desfontainei</i>	Senecionina, otosenina, ridelina.
<i>S. alpinus</i>	Senecifilina, integerrimina, jacobina, jaczina.
<i>S. subalpinus</i>	Senecionina, senecifilina, integerrimina.
<i>S. incanus</i>	Senecifilina, integerrimina.
<i>S. nemorensis</i>	Nemorensina.
<i>L. clivorum</i>	Clivorina, ligularina, ligudentina.
<i>L. elegans</i>	Clivorina, ligularina, ligudentina.
<i>L. brachyphylla</i>	Clivorina, ligularina, ligudentina.
<i>L. dentata</i>	Clivorina, ligularina, ligudentina.
<i>L. japonica</i>	Senecionina, platifilina, neopetasitenina.
<i>S. angulatus</i>	Angularina, rosmarina.
<i>S. ilicifolius</i>	Senecionina, senecifilina, retrorsina.
<i>S. inaequidens</i>	Retrorsina.
<i>S. isatidens</i>	Retrorsina, isatidina, pterofina.
<i>S. juniperinus</i>	Pterofina, retrorsina.
<i>S. othomaeiflorus</i>	Otosenina, onetina.
<i>S. pterophorus</i>	Senecionina, senecifilina, retrorsina.
<i>S. retrorsus</i>	Retrorsina, isatidina, ceratina.
<i>S. integerrimus</i>	Senecionina, integerrimina.
<i>S. squalidus</i>	Senecionina, integerrimina.
<i>H. europaeum</i>	Lasiocarpina, heliotropina.
<i>H. lasiocarpum</i>	Lasiocarpina, heliotropina.

1.1.5 Ecologia dos alcalóides

Muito se tem feito nesse campo de observações nos últimos anos. Sabe-se que plantas contendo alcalóides pirrolizidínicos estão crescendo em todo o mundo. Algumas têm estreito relacionamento com espécies animais, como é o caso de *Senecio jacobaea* e *Tyria jacobaea*, uma espécie de mariposa. Myers (1980) estudou essa relação durante um período de quatro a seis anos em nove localidades da América do Norte e concluiu que há relação entre tamanho das flores de *Senecio* e o tamanho do grupo de ovos que são depositados nelas, ou seja, a fecundidade das mariposas está diretamente ligada à população de plantas que lhes servem de alimento. Assim, se condições do solo alteram essa população, diminui também a população de mariposas. Essa constatação tem servido de base para estudos de controle biológico de *Senecio*.

Um aspecto importante dessa relação é que a mariposa não é afetada pela alta toxidez dessa planta. Em outra espécie de mariposas ocorre mesmo uma dependência dos alcalóides da planta, para a morfogênese dos órgãos do olfato, quando na fase larval (Schneider *et al.*, 1982).

Gomes e Gottlieb (1978) levantaram o aspecto da tendência evolutiva das angiospermas de substituir gradativamente a resistência física por resistência química, ou seja, dureza por toxidez. Essa proteção seria direcionada principalmente contra os mamíferos herbívoros. Assim, o aparecimento de novas combinações de alcalóides na planta poderia sugerir uma tentativa de obter alcalóides mais tóxicos ou conjuntos mais tóxicos dos alcalóides já existentes. O fato

de existirem muitos casos de duas ou mais espécies ou mesmo variedades de plantas tão semelhantes a ponto de diferirem apenas por um dos seus alcalóides parece contribuir para esse raciocínio. Note-se particularmente o das variedades da espécie brasileira de *Senecio*, em que os próprios alcalóides que distinguem as duas — a senecionina e a integerrimina — são estereoisômeros (Fig. 4).

Já nos referimos anteriormente ao fato de animais de pastagem onde essas plantas crescem abundantemente só as ingerirem quando estão novas e numa época de escassez de pasto nas secas de inverno. Briske e Camp (1981) fizeram um estudo meticoloso do potencial de água no xilema das folhas de *Senecio longilobus* por trinta e dois dias, analisando as concentrações de alcalóides por parte da planta. Observaram que a concentração total de alcalóide da planta aumenta com a carência de água. Na seca mais severa dos trinta e dois dias, houve um aumento de 4,6 vezes na concentração de alcalóides. Esse trabalho parece corroborar as sugestões de Gomes e Gottlieb (1978).

Levin e York (1978) propuseram que o potencial tóxico dos alcalóides mostra padrões geográficos e ecológicos bem definidos. Afirmaram também que a proporção de plantas alcaloidíferas nos trópicos é maior que em outras regiões. Assim, os animais dos trópicos que se alimentam de um tipo de planta desenvolvem um mecanismo de detoxicação para aquele conteúdo específico de alcalóide. Janzen (1973) observou que as pragas da região tropical têm maior capacidade de desenvolver resistência a pesticidas do que as de regiões temperadas. Sugeriu, então, que esse fato deve decorrer de uma maior

complexidade nos mecanismos de defesa contra produtos químicos, pela sua convivência obrigatória com um grande número de toxinas naturais no seu *habitat*.

Os experimentos que demonstram a diversidade de ação entre os alcalóides de uma mesma planta sugerem que a evolução no sentido da toxicidade dos alcalóides não se dá apenas em termos de qualidade, pela substituição, em um vegetal, de um alcalóide por outro mais tóxico. O grande número de combinações diferentes de alcalóides nas plantas favorece a toxicidade conjunta da planta, onde diversos alcalóides, desempenhando cada qual o seu papel, podem chegar a um efeito tóxico final mais eficiente do que a presença de um ou dois alcalóides altamente tóxicos que agem independentemente.

Em *Senecio brasiliensis* Less. var. *tripartitus*, temos dois alcalóides distintos: um tem efeito antimitótico (a integerrimina), podendo até ser demonstrado, no futuro, um efeito anticâncer, pois esses dois caracteres têm aparecido juntos; o outro é carcinogênico (retrorsina).

Todos esses fatos são peças de um enorme quebra-cabeça para cuja solução são necessários algum tempo e muita pesquisa.

1.1.6 Efeitos patológicos dos alcalóides pirrolizidínicos

Os efeitos produzidos pela ingestão de plantas portadoras de alcalóides pirrolizidínicos recebem uma denominação genérica de seneciose. Essa doença apresenta-se sob várias formas, segundo a espécie de planta ingerida, o animal que a

ingeriu e, no caso humano, a forma pela qual ela foi preparada.

Debska *et al.* (1980) demonstraram que o conteúdo de lasiocarpina de preparados a partir de raízes de *Radix symphyti* era o seguinte: decocção, 0,0002%; xarope, 0,0004%; ungüento, traços. Nessa planta, o conteúdo total de lasiocarpina nas raízes é de 0,0058%. O órgão mais atingido, em geral, é o fígado, com lesões que vão desde comprometimentos leves das veias do fígado até câncer hepático. Podem ocorrer também danos pulmonares, renais, neurológicos e gastrintestinais. Há casos de esterilidade progressiva em *Drosophila* e camundongos. Mc Lean (1970) relatou que, em experimentos de laboratório com camundongos, hamsters, coelhos, cobaias, ovelhas, galinhas, codornas, gatos, sapos e, principalmente, ratos, foi observado que o padrão de sensibilidade varia de acordo com a dose de alcalóide empregada. Assim, doses pequenas causam lesões progressivas no fígado, principalmente megalocitose, e nos pulmões. Doses elevadas causam lesões necróticas e vasculares no fígado e doses muito altas provocam morte imediata dos animais.

Miranda *et al.* (1980) observaram ratos submetidos a uma dieta com 5% de *Senecio jacobaea*. Estes eram sacrificados com uma, duas, quatro, seis e oito semanas. Em uma semana, havia diminuição de ganho de peso corporal, diminuição da alimentação, bem como da sua eficiência; aumentava o peso relativo dos pulmões, coração, baço, adrenais e testículos, com quatro semanas de tratamento, e dos rins, com seis semanas. A contagem de leucócitos aumentava com duas semanas e a de hematócrito e eritrócitos diminuía com quatro e

seis semanas respectivamente. Com quatro semanas diminuía a proteína e a albumina do soro. As principais modificações patológicas eram o aumento do baço com hiperplasia de linfóides, aumento da atividade hematopoiética, tipo atrofiado, ascite, hidrotórax e hepatite necrosante difusa, com seis a oito semanas.

Há trabalhos que afirmam poderem os alcalóides pirrolizidínicos atravessar a placenta em ratos e vacas, no sentido materno-fetal e vice-versa (Mc Lean, 1970).

No homem, todos os casos de intoxicação mostram danos hepáticos agudos e suas conseqüências, bem como a chamada doença veno-oclusiva do fígado (VOD), onde ocorre oclusão parcial ou completa das veias centrilobulares. Esse bloqueio causa uma congestão intensa e, se crônico, resulta numa cirrose centrilobular.

Mc Lean (1970) afirmou que não há ação direta dos alcalóides pirrolizidínicos sobre o aparecimento de câncer de fígado. A única relação é aquela em que o alcalóide provoca cirrose hepática e esta propicia o aparecimento de carcinoma hepático primário.

Em 1956, entretanto, Campbell já descrevia a ocorrência de câncer em galinha por ingestão desse tipo de alcalóides (Ramos, 1977).

Kuhara *et al.* (1980) estudaram a atividade carcinogênica da clivorina isolada de *Lingularia dentata*. Doze ratos receberam uma solução de 0,005% na água de beber por 340 dias e viveram cerca de 440 dias após o início do tratamento. Desses doze, oito desenvolveram tumor no fígado (sarcomas

hemangioendoteliais em dois e nódulos neoplásticos em seis). No grupo controle não apareceu nenhum tumor.

1.1.7 Ação antimitótica e antitumor

Os alcalóides pirrolizidínicos apresentam uma ação inibitória específica na mitose. As células do fígado sob seu efeito apresentam poucas mitoses, sendo estas geralmente anormais, quando ocorrem.

Segundo Downing e Peterson (1968) e Culvenor *et al.* (1969), o tratamento prévio de ratos com os alcalóides pirrolizidínicos (heliotrina, lasiocarpina e lasiocarpina N-Óxido) fez com que a taxa de mitose após hepatoctomia parcial fosse reduzida em até 50% em relação aos níveis normais. Nardi *et al.* (1980), com o mesmo procedimento, chegaram a uma inibição de até 94,22% das mitoses, com a integerrimina. Esses experimentos mostraram: 1. efeito de dose; 2. que megalócitos são células hepáticas que continuam a crescer sem se dividir por mitose; 3. há uma estreita relação entre hepatotoxicidade e efeito antimitótico.

A integerrimina foi eficiente para inibir mitose em 50% com 1/5 da dose necessária para que a lasiocarpina e a heliotrina atingissem os mesmos efeitos. Além disso, o efeito antimitótico da integerrimina estende-se por até 40 dias após o tratamento. Segundo Nardi *et al.* (1980), os megalócitos não só têm o volume aumentado, como também o conteúdo de DNA, pois os alcalóides não bloqueiam a sua síntese.

Resta saber se esse aumento no conteúdo de DNA significa uma poliploidia verdadeira ou uma duplicação irregular do genoma.

As características necessárias para a produção de efeito antimitótico parecem ser as mesmas requeridas para a hepatotoxicidade, ou seja, a dupla ligação na posição 1-2 do anel pirrolizidina e a esterificação de pelo menos um grupo hidroxil, que normalmente deve ser o hidroximetil (Downing & Peterson, 1968). O mecanismo de ação, segundo Culvenor *et al.* (1962), parece ser também o de alquilação promovido pelos metabólitos pirrólicos no fígado, diretamente sobre o DNA dos hepatócitos.

Em cultura de hepatócitos de embrião humano, a heliotrina inibiu a mitose e causou o aumento do tamanho das células (Sullman & Zuckerman, 1969).

Devido à marcante atividade antimitótica, alguns alcalóides são eficientes agentes antitumor (Puklal'skaya *et al.*, 1959; Kupchan *et al.*, 1964). Culvenor (1968) testou alcalóides e seus derivados, num total de 22 compostos, observando um ou mais tipos de tumores testados.

Um alcalóide extraído de *Senecio fendleri* mostrou-se um proeminente agente anticâncer (Pettit *et al.*, 1980). Embora muito se tenha pesquisado nesse campo, o uso dessas substâncias para tratamento de pacientes com câncer é muito problemático, dada a toxicidade desses compostos. Além disso, certos alcalóides como a monocrotalina, que se mostraram agentes antitumor em alguns trabalhos, apresentaram-se como carcinogênicos em outros (Styles *et al.*, 1980).

1.1.8 Efeitos mutagênicos e quebras cromossômicas

A análise dos efeitos mutagênicos dos alcalóides pirrolizidínicos foi iniciada por Clark (1959). Testando nove alcalóides e os derivados N-óxidos de alguns deles, determinou serem todos mutagênicos, embora com efeitos quantitativamente diferentes. Foram então classificados em três grupos: potentes, moderados e fracos. Nessa classificação, a senecionina (estereoisômero da integerrimina) foi considerada mutagênico moderado.

Os sistemas e organismos para esses testes são os mais diversos. Clark, em 1959, Brink, em 1966, e Cook e Holt, em 1966, pesquisaram a indução de letais recessivos ligados ao sexo, pela técnica da injeção em *D. melanogaster*. Quebras cromossômicas, através da proporção entre os sexos, em *D. melanogaster*, foram testadas por Clark em 1963, quer por ingestão, quer por injeção. Em 1969, Brink usou, como medida dos danos genéticos, a indução de letais dominantes, a perda parcial e completa do cromossomo sexual, as translocações e a proporção entre os sexos. Sugeriu, nesse trabalho, que muitos letais dominantes resultam de rearranjos intracromossômicos com efeito letal, ou de aberrações isocromatídicas (Ramos, 1977).

Um dado interessante é que KCN e NaN_3 , inibidores metabólicos não mutagênicos em si mesmos, quando injetados em *D. melanogaster* juntamente com heliotrina, aumentam a frequência de letais recessivos ligados ao sexo e de quebras cromossômicas (Brink, 1963). Esse resultado pode ter relação com os de Alderson e Clark (1966), em que a lasiocarpina

e a monocrotalina mostraram-se mutagênicas em *Aspergillus nidulans*. Todas essas evidências juntas parecem indicar que não é indispensável a metabolização dos alcalóides em derivados pirrólicos para a efetivação do seu caráter mutagênico.

Martin *et al.* (1972) observaram aberrações cromossômicas em crianças e fetos de ratos expostos à fulvina.

Outros sistemas, utilizando bactérias (*E. coli* e *Salmonella*) foram empregados, com a adição de fração microsomal hepática de rato, para propiciar a metabolização dos alcalóides (Green & Muriel, 1975; Yamanaka *et al.*, 1979). Williams *et al.* (1980) compararam os resultados de um novo tipo de teste (cultura de hepatócito primário de rato/DNA-reparo) com um teste *Salmonella*/microsomo modificado e concluíram serem ambos eficientes na detecção de mutagenicidade. Styles *et al.* (1980) usaram o teste de transformação de células de mamíferos, onde as próprias células-teste são capazes de metabolizar os alcalóides, sem necessidade de fonte de enzimas metabolizadoras.

Outro meio de testar os derivados pirrólicos dos alcalóides pirrolizidínicos em microorganismos é fazer a conversão *in vitro* por processos químicos, numa primeira etapa.

Ramos (1977) e Ramos e Marques (1978) testaram os efeitos mutagênicos da mistura de integerrimina e retrorsina, os dois alcalóides de *Senecio brasiliensis* var. *tripartitus* e a integerrimina pura. Tanto a mistura como o alcalóide induziram mutações letais recessivas ligadas ao cromossomo X em *D. melanogaster*.

1.1.9 Ação sobre os ácidos nucleicos

Reddy *et al.* (1968) observaram que a lasiocarpina interfere na transcrição da molécula de DNA, interagindo com a RNA polimerase. Sullman e Zuckerman (1969) relataram a inibição da síntese de DNA e RNA pela heliotrina, em cultura de hepatócitos de embrião humano. Essa ação se dá diretamente sobre o DNA e a RNA polimerase.

A desidroheliotrina, derivado pirrólico da heliotrina, interage *in vitro* tanto com o DNA nativo, como com o desnaturado pelo calor (Black & Jago, 1970). Por outro lado, DNA de *E. coli* de fígado de rato pré-tratado com metabólitos pirrólicos da monocrotalina e da retrorsina apresenta, *in vitro*, maior grau de renaturação após o tratamento por calor, que o apresentado pelos controles (White & Mattocks, 1972).

1.2 INTEGERRIMINA

1.2.1 Histórico

Em 1936, Barger e Blackie obtiveram, a partir de *Senecio squalidus*, um novo alcalóide pirrolizidínico, que denominaram esqualidina. Embora a insuficiência de material coletado não permitisse maiores caracterizações, foram capazes de determinar que esse novo alcalóide é isômero da senecionina e, como ela, é um éster de retrorsina com baixo ponto de fusão e grande solubilidade em álcool.

Manske (1939), que já vinha trabalhando com alcalóides de *Senecio*, extraiu a integerrimina de *Senecio integerrimus*.

Estes alcalóides foram estudados individualmente durante muitos anos, por diversos pesquisadores. Kropman e Warren (1950) sugeriram, em decorrência de relações estereoquímicas, que a esqualidina e a integerrimina eram, na verdade, a mesma substância. Adams e Duuren (1953), trabalhando com integerrimina extraída de *Crotalaria incana*, criticaram os resultados de Kropman e Warren, por terem encontrado diferenças de rotação ótica dos alcalóides e dos pontos de fusão de seus picratos. Apenas em 1958 essa questão foi elucidada por González e Calero, que isolaram a integerrimina de *Senecio kleinia* e compararam o seu nitrato com o nitrato de esqualidina, concluindo que ambas eram a mesma substância.

Antes desse trabalho, porém, Moraes (1952), no Brasil, havia extraído um novo alcalóide, a partir de *Senecio brasiliensis*, var. *tripartitus*, denominando-o brasilinecina, substância essa que foi analisada por Motidome e Ferreira (1966), que determinaram ser ela nada mais que a integerrimina, na sua primeira extração de uma espécie brasileira de *Senecio*.

1.2.2 Ocorrência na natureza

Muitas são as espécies, em diferentes gêneros, que contêm integerrimina como o seu alcalóide principal ou secundário. A Tabela 3 relaciona algumas plantas e os

Tabela 3. Plantas de onde se extraiu integerrimina.

PLANTAS	AUTORES	REFERÊNCIAS
<i>Senecio integerrimus</i>	Manske	MANSKE, 1939
<i>Senecio squalidus</i>	Barger e Blackie	BARGER & BLACKIE, 1936
<i>Senecio kleinia</i> Sch.Bip.	González e Calero	GONZÁLEZ & CALERO, 1958
<i>Senecio erraticus</i>	Santavý; Schröter	KLÁSEK, 1973
<i>Senecio viscosus</i>	Santavý	KLÁSEK, 1973
<i>Senecio alpinus</i>	Klásek e Santavý	KLÁSEK, 1973
<i>Senecio subalpinus</i>	Klásek e Santavý; Trivedi e Santavý	KLÁSEK, 1973
<i>Senecio incanus</i>	Klásek e Santavý	KLÁSEK, 1973
<i>Senecio brasiliensis</i> Less var. <i>tripartitus</i>	Moraes; Motidome e Ferreira	MORAES, 1955; MOTIDOME & FERREIRA, 1966
<i>Crotalaria incana</i> Linn	Adams e Duuren	ADAMS & DUUREN, 1953

respectivos trabalhos de extração da integerrimina.

No Brasil, *S. brasiliensis*, var. *tripartitus*, é de grande importância, dada a sua abundância mormente na região centro-sul.

Em geral, cada alcalóide não aparece sozinho na planta, mas associado a um ou mais alcalóides do mesmo grupo. Assim, na variedade brasileira, a integerrimina encontra-se associada à retrorsina.

1.2.3 Bioquímica

A integerrimina é um alcalóide pirrolizidínico, ou seja, apresenta o núcleo heterocíclico pirrolizidina contendo um átomo de nitrogênio. É um éster de retronecina (Barger & Blackie, 1936), estereoisômero da senecionina, alcalóide principal de *S. brasiliensis*, var. *brasiliensis*, no qual ela se pode interconverter por ação de agentes físicos e químicos. Seu peso molecular é 335. As fórmulas estruturais, citadas por Klásek (1973) e as fórmulas moleculares dos alcalóides das variedades brasileiras de *Senecio brasiliensis*, bem como de seus ácidos e bases, encontram-se referidos na Fig. 9.

1.2.4 Obtenção e purificação do alcalóide

Para a obtenção do alcalóide bruto, devem-se levar em conta três aspectos práticos:

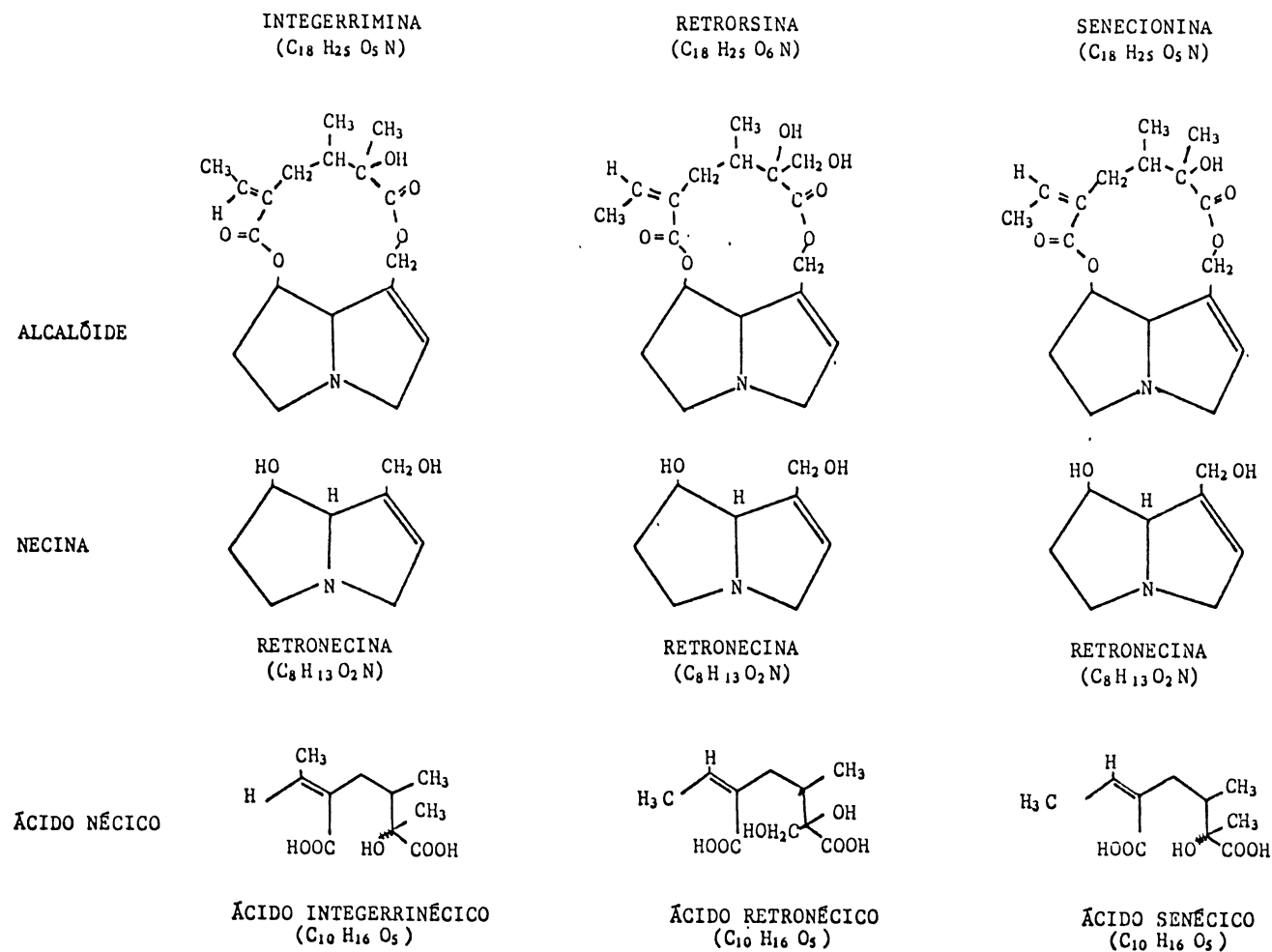


Fig. 9. Fórmulas estruturais (Klášek, 1973) e fórmulas moleculares dos alcalóides das variedades brasileiras de *Senecio brasiliensis* e de seus ácidos e bases.

1. Como a concentração de alcalóide na planta varia de acordo com sua fase de crescimento (Moraes, 1952), escolhe-se, para coleta, o período de fins de setembro até novembro, compreendendo o período de máximo desenvolvimento, antes da floração.

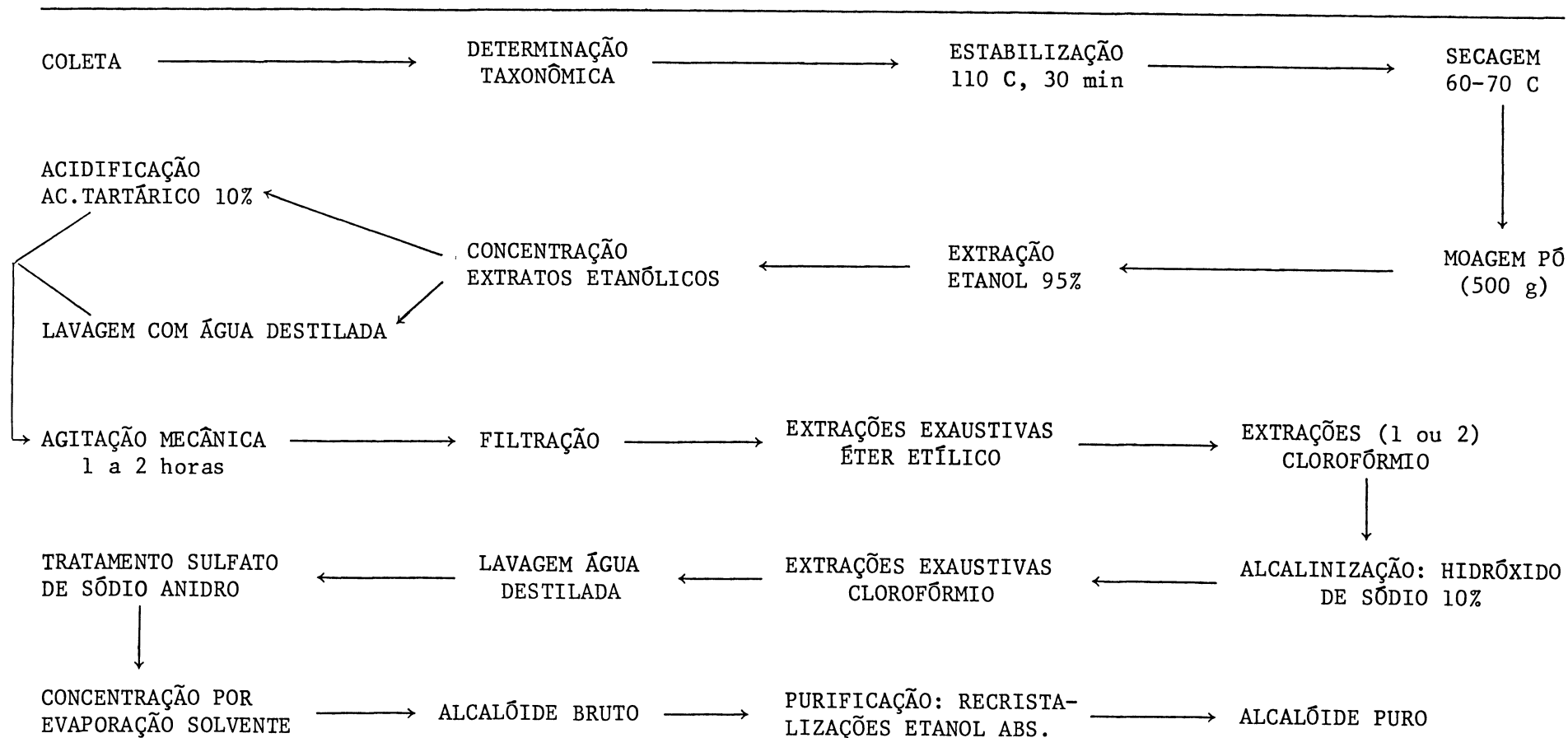
2. O alcalóide está presente em todos os órgãos da planta em concentrações semelhantes (Motidome & Ferreira, 1966). No entanto, apesar de alta densidade de pigmento, escolhem-se as folhas por sua maior abundância.

3. Pelo fato de as diferentes variedades de *Senecio brasiliensis* não apresentarem o mesmo alcalóide principal e oferecerem grande dificuldade na distinção botânica, as coletas costumam ser feitas em um mesmo local.

A seqüência de extração dos alcalóides é feita segundo a técnica de Novelli e Varela, com modificações de Motidome e Ferreira (Ramos, 1977), e está esquematizada na Tabela 4.

Dessa maneira, obtém-se o alcalóide bruto, ou seja, uma mistura dos alcalóides presentes na planta. Para análise dessa mistura, faz-se cromatografia em camada delgada; para separação e purificação do alcalóide principal, cromatografia em coluna de alumina, com várias recristalizações da fração principal, de etanol; e para identificação dessa fração principal, mede-se seu ponto de fusão e faz-se sua análise no espectro infravermelho.

Tabela 4. Sequência de extração de alcalóides segundo a técnica de Novelli e Varela, com modificações de Motidome e Ferreira (Ramos, 1977).



1.3 SISTEMA METIONINA EM *A. NIDULANS*

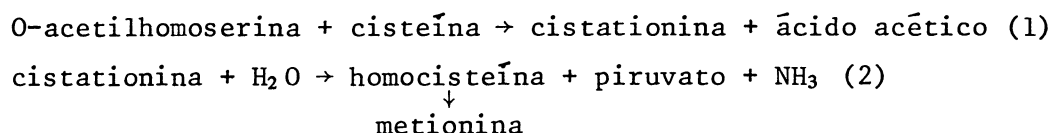
1.3.1 Histórico

A maioria dos trabalhos a respeito da mutagênese química em *Aspergillus* tem sido realizada com um dos três sistemas seguintes: metionina, 2-tioxantina e arginina. Os dois primeiros são capazes de detectar mudanças de pares de bases e pequenas deleções, enquanto que o tipo de dano indicado pelo terceiro é ainda desconhecido (Scott *et al.*, 1982).

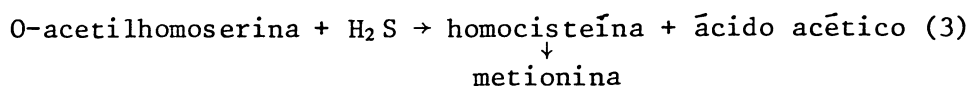
O sistema da reversão do caráter requerimento para independência de metionina foi idealizado e desenvolvido inicialmente pela Dra. L.J. Lilly (Siddiqi, 1962) e amplamente usado, desde então, para teste de mutagenicidade de agentes físicos e químicos (Alderson & Clark, 1966; Ball & Roper, 1966; Chang *et al.*, 1968; Wohlrab & Tuveson, 1969, *apud* Clutterbuck, 1975; Duarte, 1972; Klimczuk, 1970; Lilly, 1965; Prasad, 1970, *apud* Scott *et al.*, 1982; Scott *et al.*, 1973; Sharma, 1970; Siddiqi, 1962).

1.3.2 Bioquímica do sistema metionina

Em *Aspergillus nidulans*, a síntese da metionina segue uma via natural dada pelas reações:



e uma via alternativa, por sulfidrilação direta:



A reação 1 é catalisada por γ -sintetase, a reação 2 por β -cistationase, e a reação 3 por homocisteína sintetase.

Neurospora utiliza-se da seqüência via cistationina e *Sacharomyces cerevisiae*, da reação 3 (Paszewski & Grabski, 1974).

Em *Aspergillus* encontram-se as enzimas para catalisar ambas as reações, sendo que a 2 e a 3 são parcialmente reprimidas quando o micélio cresce em presença de metionina ou homocisteína (Paszewski & Grabski, 1973; 1975a). No entanto, a via cistationina parece ser a natural, uma vez que mutantes que perderam a β -cistationase são dependentes da metionina e mutantes que perderam a homocisteína-sintetase são prototróficos.

A cisteína, por sua vez, bloqueia a homocisteína-sintetase, pois mutações Cys B1 e Cys C1, que impedem a síntese de cisteína, são capazes de desreprimir a homocisteína-sintetase. A mutação sul01 que parece promover um intenso catabolismo da cisteína, acumulando hipotaurina, pode fazer com que a O-acetilhomoserina, normalmente utilizada pela via regular, seja aproveitada na via alternativa, ou seja, a catalisada por homoserina-sintetase. No entanto, o pouco efeito supressor dessa mutação leva a considerar que não importa apenas diminuir o nível de cisteína na célula, mas que também a concentração de O-acetilhomoserina pode ser consideravelmente importante na utilização dessa reação (Paszewski & Grabski, 1975a).

Assim, quando ocorre uma mutação estrutural qualquer em uma das enzimas envolvidas no processo normal, ou seja, as reações 1 e 2, o fungo é incapaz de utilizar a via alternativa, pois continua produzindo cisteína e O-acetilhomoserina, não podendo então sobreviver sem a presença de metionina no

meio, tornando-se um auxotrófico meth⁻.

Dessa maneira, fica claro que, para circundar a incapacidade de sintetizar metionina, causada por uma mutação, só há duas opções: uma mutação reversa ou uma nova mutação de maneira a desreprimir a via alternativa, ou seja, uma reversão no caráter dependência de metionina via supressor.

1.3.3 Genética do sistema metionina

Em experimentos com *Aspergillus nidulans*, Lilly (1965) observou uma freqüência de reversão espontânea de requerimento para independência de metionina (meth 1) em conídios, de $1/6.10^{-4}$, que é pelo menos 100 vezes maior que a freqüência encontrada para outros *loci*, como ad 8, lys 5, etc. Esta observação inicial propiciou, em ensaios posteriores, determinar que a reversão ocorre, em sua maioria, através de mutações em *loci* supressores; aliás, em inúmeros trabalhos realizados jamais se mencionou uma mutação reversa sequer.

Através de cruzamentos entre revertentes estabeleceram-se 8 *loci* não ligados, para determinação do caráter meth⁻, ou seja, meth A, meth B, meth C, meth D, meth E, meth F, meth G (o original meth 1) e meth H (o original meth 2) (Gajewski & Litwinska, 1968).

Por meio de experimentos nutricionais e bioquímicos, determinou-se o bloqueio de cada mutante, bem como, por meio de ensaios com diplóides, foram todos os 8 *loci* devidamente mapeados, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5. Enfoque bioquímico dos genes do sistema metionina (Käfer, 1958; Forbes, 1959; Gajewski & Litwinska, 1968; Clutterbuck, 1975; Paszewski & Grabski, 1975a).

MUTANTES	PASSOS ENZIMÁTICOS BLOQUEADOS	NÚMERO DE ALELOS	ENZIMAS ENVOLVIDAS	GRUPO DE LIGAÇÃO
Meth A	Cisteína → cistationina	8	Cistationina γ -sintetase	II
Meth B	Cisteína → cistationina	22	Cistationina γ -sintetase	VI
Meth C		1	*	I
Meth D	Homocisteína → metionina	1	**	III
Meth E	Homoserina → O-acetilhomoserina	7	Homoserina acetiltransferase	VII
Meth F	Cistationina → homocisteína	1	β -cistationase	IV
Meth G1	Cistationina → homocisteína	12	β -cistationase	IV
Meth H2	Homocisteína → metionina	1	**	III

*Não pode ser desenvolvido, pois foi perdida (Gajewski & Litwinska, 1968).

**Necessitam maiores estudos (Paszewski & Grabski, 1975b).

Em ausência de metionina, os revertentes aparecem com diferentes aspectos morfológicos. Lilly (1965) classificou-os em três grupos:

TIPO A: colônias grandes e verdes, de aspecto semelhante ao tipo selvagem.

TIPO B: colônias menores que A, com pigmento marrom e esporulação esparsa.

TIPO C: colônias pequenas, verdes, com um halo hialino, aspecto compacto e densamente esporuladas.

Através de cruzamentos, determinou-se que os tipos A e C são devidos a pelo menos 2 diferentes *loci*, cada um (Lilly, 1965; Siddiqi, 1962). Scott e Alderson (1971) determinaram, por método indireto, que o fenótipo B se deve a dois genes distintos. Entretanto, experimentos realizados por Gajewski e Litwinska (1968) apresentaram dezenas de supressores indicando que o número desses *loci* é muito maior do que se pensava. Nesse mesmo trabalho, os alelos mostraram-se recessivos em sua grande maioria, assim como nenhum dos inúmeros supressores testados mostrou-se sítio-específico. No máximo, encontra-se uma atividade de "gene-grupo-específica", ou seja, um grupo de supressores atua sobre um *locus* meth (Gajewski & Litwinska, 1968; Putrament *et al.*, 1970). Esta constatação exclui qualquer hipótese baseada na supressão ao nível translacional (Yanofsky & St. Lawrence, 1960; Benzer & Champe, 1962).

Na verdade, o que parece ocorrer é uma mutação que, de uma ou de outra forma, acaba por abrir um caminho alternativo já existente para a célula, mas fechado por acharem-se

presentes as condições para iniciar-se o trajeto regular, que apenas não se completa por algum bloqueio em um dos passos, devido a uma mutação. Não se dando, pois, a desrepressão automática quando do bloqueio da via normal, as células viáveis serão apenas as que, por um novo evento mutacional, tiverem meios de contornar a repressão, passando a sintetizar metionina por uma via que não utilize a enzima defectiva em consequência da primeira mutação (Ayling, 1969). A Fig. 10 mostra a ação de alguns dos supressores do sistema metionina.

O caráter evolutivo presente neste sistema é efetivamente notável. Por um lado, mais de um caminho alternativo já estão presentes no "programa celular", enquanto outros se desenvolvem, como nos parece o caso descrito por Paszewski e Grabski (1975b), onde a homocisteína entra no lugar da cisteína, na reação principal, resultando em homolantionina, homóloga da cistationina, ao invés da própria cistationina. Dessa forma, a enzima cistationina γ -sintetase mostra-se capaz de admitir, sem necessitar qualquer alteração, participar de uma reação diferente da original, que poderá, após algumas alterações, vir a constituir mais uma opção para a célula. Não menos importante que este tipo de tentativas, para o sistema, por outro lado vemos a alta potencialidade mutacional dos *loci* supressores, bem como o seu grande número, como uma série de chaves que o organismo desenvolve e utiliza na busca de abrir esses novos caminhos.

Esta riqueza de recursos oferecida pelo sistema metionina não se encontra em outros sistemas, onde a célula, para contornar uma deficiência causada por uma mutação

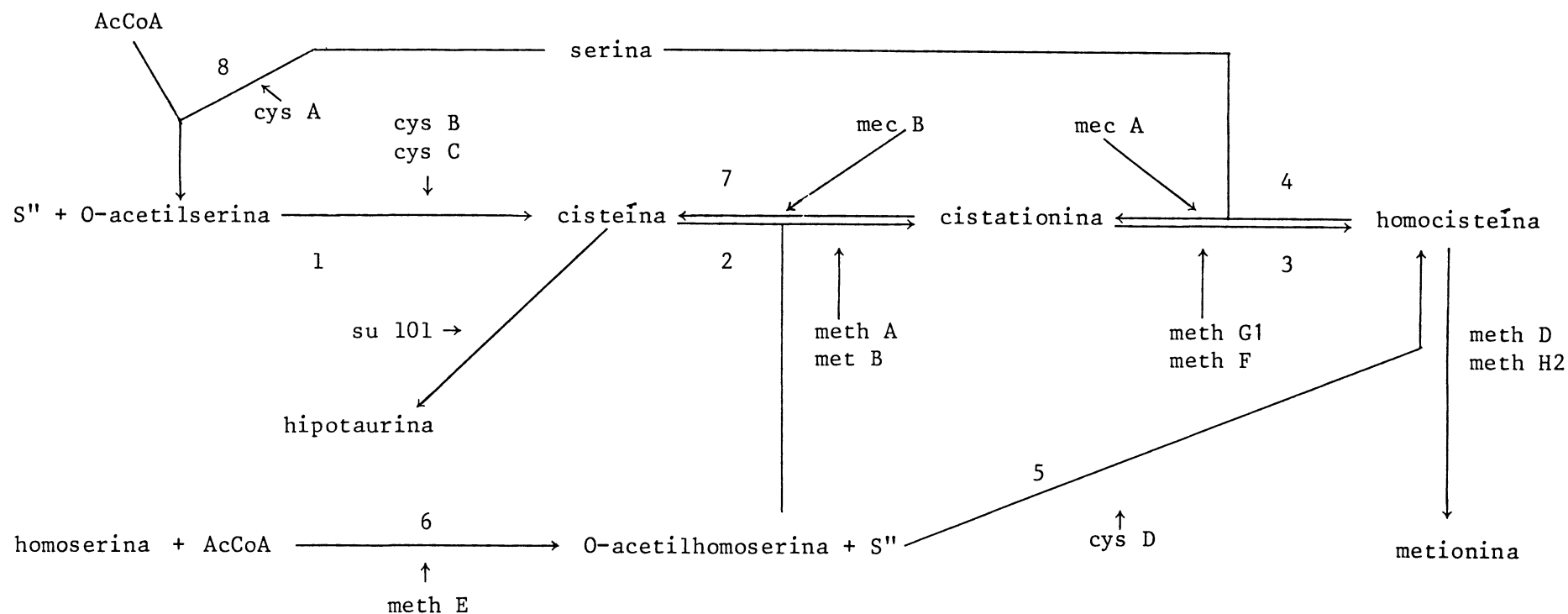


Fig. 10. Metabolismo em *A. nidulans*. Enzimas que catalisam as reações: 1) cisteína sintetase (E.C. 4.2.99.8); 2) cistationina γ -sintetase (E.C. 4.2.9.9.9); 3) β -cistationase (E.C. 4.4.1.8); 4) cistationina β -sintetase (E.C. 2.1.22); 5) homocisteína sintetase; 6) homoserina acetiltransferase (E.C. 2.3.1.31); 7) γ -cistationase (E.C. 4.4.1.1); 8) serina acetiltransferase (E.C. 2.3.1.30). (Paszewski & Grabski, 1975a, b).

no gene que codifica uma enzima importante, só conta com a possibilidade de uma mutação reversa verdadeira.

É óbvio, pois, que a frequência de reversão para o caráter metionina seja da ordem de pelo menos 100 vezes maior que a de outros sistemas.

1.4 OBJETIVOS

Devido à escassez de trabalhos sobre os efeitos mutagênicos dos alcalóides das espécies brasileiras de *Senecio* e a parca informação sobre o uso de *Aspergillus nidulans* para os testes de mutagenicidade dos alcalóides pirrolizidínicos, este trabalho objetivou testar a integerrimina no sistema genético da metionina neste fungo e avaliar:

1. efeito mutagênico desse alcalóide;
2. especificidade intergênica da ação mutagênica;
3. diferenças de especificidade intergênica da integerrimina e do dietil sulfato.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Linhagem

A linhagem usada foi, como na maioria dos experimentos com o sistema haplóide da metionina, a deficiente para a síntese de biotina e metionina, originária de Glasgow: biA1 methG1 (Clutterbuck, 1975). Ela apresenta duas grandes vantagens: não tem translocações e a mutação biA1 confere-lhe uma maior permeabilidade da parede celular a substâncias externas (Scott *et al.*, 1982). Esta linhagem estava estocada em sílica-gel e nos foi cedida pelo Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, do Laboratório de Genética da Universidade de Brasília.

2.1.2 Produtos químicos para teste de mutagenicidade

A integerrimina (I) extraída em Porto Alegre e purificada em São Paulo pelo Dr. Mário Motidome, foi-nos gentilmente fornecida por Ana Lígia de Paula Ramos, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

O dietil sulfato (DES) foi testado para que se pudesse estabelecer uma comparação dos resultados com os de Alderson e Clark (1966), com lasiocarpina e heliotrina.

Como a integerrimina é dissolvida em HCl 0,1N, testamos o possível efeito dessa substância sobre a viabilidade e a mutagênese, para evitar eventuais distorções nos resultados com o alcalóide.

2.1.3 Meios de cultura e soluções

Os meios feitos segundo Pontecorvo *et al.* (1953) foram os seguintes: meio mínimo mais biotina, mais metionina e meio mínimo mais biotina. Para fazer a suspensão de esporos, a lavagem pós-tratamento e as diluições necessárias, foi utilizado, ao invés de solução salina ou água destilada, tampão fosfato (TF) 0,2M, pH = 7,0 (Alderson & Clark, 1966).

As soluções de substâncias para avaliação do potencial mutagênico foram feitas da seguinte maneira:

DES - usado na concentração 0,05M, foi adicionado diretamente com pipeta sobre a suspensão de esporos.

INTEGERRIMINA - usada nas concentrações 0,0025M, 0,005M e 0,01M, foi diluída por quantidade apenas suficiente de HCl 0,1N (2ml/33,5mg) e completado o volume com solução tampão fosfato 0,2M pH = 7,0 (Ramos, 1977).

HCl - foi adicionado aos tubos de tratamento com integerrimina 0,0025M e 0,005M para que a sua concentração fosse a mesma dos que receberam integerrimina 0,01M e dos controles para o HCl.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Tratamento

Foram coletados conídios de três diferentes placas de *A. nidulans* biA1 methG1, crescido durante cinco dias em meio completo e em seguida transferidos para uma solução de tween 80 0,1% na proporção 1/10ml em tampão fosfato 0,2M, pH = 7,0. Após agitação mecânica para desagregar as cadeias de conídios, a densidade da suspensão foi estimada em hemocitômetro, obtendo-se $2,7 \times 10^6$ /ml para ensaio da integerrimina e $3,8 \times 10^6$ /ml para ensaio do DES. Os conteúdos dos tubos de tratamento estão referidos na Tabela 6.

Os tubos de tratamento e controle do DES foram levados ao banho-maria a 37°C por 30 minutos. Os tubos de tratamento e controle da integerrimina permaneceram em estufa a 37°C por 24 horas. Após esse tempo, todos os tubos foram centrifugados a 3.500rpm durante 10 minutos, tendo sido desprezado o sobrenadante. Foram então colocados 5ml de tampão fosfato 0,2M, pH = 7,0 por tubo.

2.2.2 Semeadura e incubação

Foram ensaiadas 15 placas com aproximadamente 20ml de meio de cultura para cada tratamento, ou seja, para cada tubo, sendo 5 de meio mínimo, mais biotina, mais metionina e 10 de meio mínimo mais biotina. Para semear em meio mínimo mais biotina, mais metionina, procedemos à diluição da suspensão de conídios já submetida a tratamento, em tubos com 9ml de tampão fosfato 0,2M, pH = 7,0, obtendo suspensões de até 10^{-4} da original.

Conteúdos dos tubos para tratamento.

DE TRATAMENTO	SUSPENSÃO DE CONÍDIOS	TF 0,2M pH = 7	DES	INTEGERRIMINA	HCl 0,1N
ole DES	3 ml	2,0 ml	-	-	-
mento DES	3 ml	1,9 ml	0,1 ml	-	-
errimina 0,0025 M	3 ml	0,75 ml	-	4,1875 mg → I 0,25 ml → HCl 0,25 ml → TF	0,75 ml
errimina 0,005 M	3 ml	0,5 ml	-	8,375 mg → I 0,5 ml → HCl 0,5 ml → TF	0,5 ml
errimina 0,01 M	3 ml	-	-	16,75 mg → I 1 ml → HCl 1 ml → TF	-
ole integerrimina	3 ml	2,0 ml	-	-	-
ole HCl	3 ml	1,0 ml	-	-	1 ml

As placas de meio mínimo mais biotina receberam a suspensão inicial sem diluições.

A semeadura foi feita pipetando-se 0,1ml da suspensão de conídios por placa, sobre o meio sólido, espalhando-se, em seguida, o material, com espalhador de vidro passado em álcool e flambado.

As placas foram levadas para a estufa a 37°C, por 5 dias.

Todo este procedimento foi desenvolvido 3 vezes, completamente independente uma da outra.

2.2.3 Contagem das colônias

São duas as contagens para cada tratamento, bem como para cada controle:

1. contagem de todas as colônias das placas de meio mínimo mais biotina mais metionina. Faz-se uma média do número de colônias por placa, levando em consideração as diversas diluições usadas, para obter um número de conídios viáveis por ml de suspensão de conídios semeada.

2. contagem das colônias dos diversos tipos morfológicos, segundo a classificação de Lilly (1965) (tipos A, B e C) e a de Gajewski e Litwinska (1968) (tipo 1: correspondente à soma dos tipos A e C de Lilly; tipo 2: correspondente ao tipo B de Lilly; tipo 3: colônias pequenas, compactas e brancas; e tipo 4: todas as outras que não se enquadram nesses tipos). Somam-se os resultados das 10 placas de cada tratamento ou controle, de forma a obter um número de mutantes por ml de suspensão de conídios semeada.

2.2.4 Análise dos dados

Como o número de mutantes é diretamente relacionado ao número de conídios viáveis que foram semeados, o primeiro procedimento é obter um número de mutantes para um grupo determinado de conídios viáveis, bastando para isso dividir o número total de mutantes de cada tratamento, de cada experimento, pelo respectivo número de conídios viáveis. Esse número é a frequência de reversão para a característica metionina. Nos grupos sem tratamento, essa frequência é a taxa de reversão espontânea e, nas placas de cada tratamento, ela é a taxa de reversão induzida. Se repetirmos o mesmo procedimento para cada tipo de mutante, obteremos o "número relativo de mutantes".

A análise estatística desses resultados indica o efeito ou não das substâncias testadas, sobre a taxa de mutação (reversão), sobre a ocorrência de especificidade intergênica das mutações espontâneas e induzidas e sobre os possíveis efeitos de dose da integerrimina.

3 RESULTADOS

Os resultados estão nas Tabelas 7, 8 e 9. Nesta última, temos todos os dados das duas anteriores, de maneira que os tipos A, B e C são os da Tabela 7 (classificação de Lilly). Os tipos D e E correspondem aos tipos 3 e 4 de Gajewski e Litwinska, respectivamente (Tabela 8). As colônias tipo "pseudo B", marrons com conídios verdes, referidas por Alderson e Clark (1966), foram raras tanto nos controles como nos tratamentos com integerrimina. Já nos experimentos de tratamento com DES, foram bastante numerosas. Em todos os casos, foram agrupadas com as do tipo B.

Para a análise estatística foi empregado o teste χ^2 (Siddiqi, 1962; Alderson & Clark, 1966).

Não houve diferença na viabilidade entre os grupos de controle, nem entre o controle da integerrimina e o tratamento com HCl. Para o DES a sobrevivência foi de 60% em média.

Da mesma forma, as mutações espontâneas não mostraram especificidade por tipo de colônia, a um nível de significância de 10^{-3} , como mostra a Tabela 10.

No tratamento com dietil sulfato, percebemos um incremento significativo na taxa de mutação (Tabela 11), preferencialmente do tipo A (45%) e B (38%), aparecendo significativamente menos C (17%) (Tabela 10).

Tabela 7. Efeitos mutagênicos de DES e integerrimina na reversão do caráter metionina da linhagem biA1 methG1 de *Aspergillus nidulans*.

TIPO DE TRATAMENTO		Nº DE CONÍDIOS VIÁVEIS ($\times 10^{-5}$) por ml	Nº E TIPO DE MUTANTES/ml			Nº DE MUTANTES (A + B + C) POR 10^5 CONÍDIOS VIÁVEIS	NÚMERO RELATIVO DE MUTANTES		
			A	B	C		A	B	C
C _{DES}	1	5,70	3	7	1	1,93	0,5264	1,2282	0,1755
C _{DES}	2	7,38	3	6	6	2,03	0,4060	0,8120	0,8120
C _{DES}	3	7,20	1	8	4	1,81	0,1392	1,1138	0,5570
Total		20,28	7	21	11	1,92	0,3446	1,0338	0,5415
DES	1	4,50	103	71	29	45,11	22,8883	15,7774	6,4443
DES	2	3,20	112	93	37	75,63	35,0023	29,0644	11,5633
DES	3	4,65	46	59	32	29,46	9,8917	12,6872	6,8812
Total		12,35	261	223	98	47,13	21,1356	18,0584	7,9360
C _{INT}	1	5,58	3	2	3	1,43	0,5363	0,3575	0,5363
C _{INT}	2	9,38	3	2	1	0,64	0,3200	0,2133	0,1067
C _{INT}	3	3,93	1	5	2	2,04	0,2550	1,2750	0,5100
Total		18,89	7	9	6	1,16	0,3691	0,4745	0,3164
C _{HCl}	1	8,05	4	1	3	0,99	0,4950	0,1238	0,3713
C _{HCl}	2	10,53	2	4	3	0,85	0,1889	0,3778	0,2833
C _{HCl}	3	4,25	1	2	1	0,94	0,2350	0,4700	0,2350
Total		22,83	7	7	7	0,92	0,3067	0,3067	0,3067
I 0,0025	1	5,00	4	4	5	2,60	0,8000	0,8000	1,0000
I 0,0025	2	8,10	6	4	10	2,47	0,7410	0,4940	1,2350
I 0,0025	3	4,93	3	6	3	2,43	0,6075	1,2150	0,6075
Total		18,03	13	14	18	2,50	0,7222	0,7778	1,0000
I 0,005	1	6,90	13	7	16	5,22	1,8850	1,0150	2,3200
I 0,005	2	9,32	10	13	23	4,94	1,0739	1,3961	2,4700
I 0,005	3	5,38	12	7	8	5,02	2,2311	1,3015	1,4874
Total		21,60	35	27	47	5,05	1,6216	1,2509	2,1775
I 0,01	1	9,43	10	15	16	4,35	1,0610	1,5915	1,6976
I 0,01	2	6,98	10	16	13	5,59	1,4333	2,2933	1,8633
I 0,01	3	3,40	4	8	8	5,88	1,1760	2,3520	2,3520
Total		19,81	24	39	37	5,05	1,2120	1,9695	1,8685

Tabela 8. Efeitos mutagênicos de DES e integerrimina na reversão do caráter metionina da linhagem biA1 methG1 de *Aspergillus nidulans*.

TIPO DE TRATAMENTO		Nº DE CONÍDIOS VIÁVEIS ($\times 10^{-5}$) por ml	Nº E TIPO DE MUTANTES/ml				Nº DE MUTANTES (A + B + C + D) POR 10^5 CONÍDIOS VIÁVEIS	NÚMERO RELATIVO DE MUTANTES			
			1	2	3	4		1	2	3	4
CDES	1	5,70	4	7	0	0	1,93	0,7018	1,2282	0	0
CDES	2	7,38	9	6	1	0	2,17	1,2206	0,8138	0,1356	0
CDES	3	7,20	5	8	0	1	1,94	0,6929	1,1086	0	0,1386
Total		20,28	18	21	1	1	2,02	0,8868	1,0346	0,0493	0,0493
DES	1	4,50	132	71	4	0	46,00	29,3333	15,7778	0,8889	0
DES	2	3,20	149	93	5	4	78,44	46,5640	29,0634	1,5625	1,2500
DES	3	4,65	78	59	2	8	31,61	16,7727	12,6870	0,4301	1,7203
Total		12,35	359	223	11	12	48,99	29,0701	18,0575	0,8907	0,9717
CINT	1	5,58	6	2	0	1	1,61	1,0733	0,3578	0	0,1789
CINT	2	9,38	4	2	0	0	0,64	0,4267	0,2133	0	0
CINT	3	3,93	3	5	0	0	2,04	0,7650	1,2750	0	0
Total		18,89	13	9	0	1	1,22	0,6896	0,4774	0	0,0530
CHCl	1	8,05	7	1	2	0	1,24	0,8680	0,1240	0,2480	0
CHCl	2	10,53	5	4	0	0	0,85	0,4722	0,3778	0	0
CHCl	3	4,25	2	2	0	0	0,94	0,4700	0,4700	0	0
Total		22,83	14	7	2	0	1,01	0,6148	0,3074	0,0878	0
I 0,0025	1	5,00	9	4	3	0	3,20	1,8000	0,8000	0,6000	0
I 0,0025	2	8,10	16	4	2	1	2,84	1,9757	0,4939	0,2470	0,1235
I 0,0025	3	4,93	6	6	1	4	3,45	1,3800	1,3800	0,2300	0,9200
Total		18,03	31	14	6	5	3,11	1,7216	0,7775	0,3332	0,2777
I 0,005	1	6,90	29	7	5	2	6,23	4,2016	1,0142	0,7244	0,2898
I 0,005	2	9,32	33	13	4	4	5,79	3,5383	1,3939	0,4289	0,4289
I 0,005	3	5,38	20	7	2	2	5,76	3,7161	1,3006	0,3716	0,3716
Total		21,60	82	27	11	8	5,93	3,7989	1,2509	0,5096	0,3706
I 0,01	1	9,43	26	15	2	0	4,56	2,7572	1,5907	0,2121	0
I 0,01	2	6,98	23	16	0	0	5,59	3,2967	2,2933	0	0
I 0,01	3	3,40	12	8	1	4	7,35	3,5280	2,3520	0,2940	1,1760
Total		19,81	61	39	3	4	5,40	3,0785	1,9682	0,1514	0,2019

Tabela 9. Efeitos mutagênicos de DES e integerrimina na reversão do caráter metionina da linhagem biA1 methG1 de *Aspergillus nidulans*.

TIPO DE TRATAMENTO	Nº DE CONÍDIOS VIÁVEIS ($\times 10^{-5}$) por ml	Nº E TIPO DE MUTANTES/ml					Nº DE MUTANTES (A + B + C + D + E) POR 10^5 CONÍDIOS VIÁVEIS	NÚMERO RELATIVO DE MUTANTES				
		A	B	C	D	E		A	B	C	D	E
CDES 1	5,70	3	7	1	0	0	1,93	0,5264	1,2282	0,1755	0	0
CDES 2	7,38	3	6	6	1	0	2,17	0,4069	0,8138	0,8138	0,1356	0
CDES 3	7,20	1	8	4	0	1	1,94	0,1386	1,1086	0,5543	0	0,1386
Total	20,28	7	21	11	1	1	2,02	0,3449	1,0346	0,5420	0,0493	0,0493
DES 1	4,50	103	71	29	4	0	46,00	22,8889	15,7778	6,4444	0,8889	0
DES 2	3,20	112	93	37	5	4	78,44	35,0011	29,5629	11,5629	1,5625	1,2500
DES 3	4,65	46	59	32	2	8	31,61	9,8916	12,6870	6,8811	0,4301	1,7203
Total	12,35	261	223	98	11	12	48,99	21,1345	18,0575	7,9356	0,8907	0,9717
CINT 1	5,58	3	2	3	0	1	1,61	0,5367	0,3578	0,5367	0	0,1789
CINT 2	9,38	3	2	1	0	0	0,64	0,3200	0,2133	0,1067	0	0
CINT 3	3,93	1	5	2	0	0	2,04	0,2550	1,2750	0,5100	0	0
Total	18,89	7	9	6	0	1	1,22	0,3713	0,4774	0,3183	0	0,0530
CHCL 1	8,05	4	1	3	2	0	1,24	0,4960	0,1240	0,3720	0,2480	0
CHCL 2	10,53	2	4	3	0	0	0,85	0,1889	0,3778	0,2833	0	0
CHCL 3	4,25	1	2	1	0	0	0,94	0,2350	0,4700	0,2350	0	0
Total	22,83	7	7	7	2	0	1,01	0,3074	0,3074	0,3074	0,0878	0
I 0,0025 1	5,00	4	4	5	3	0	3,20	0,8000	0,8000	1,0000	0,6000	0
I 0,0025 2	8,10	6	4	10	2	1	2,84	0,7409	0,4939	1,2348	0,2470	0,1235
I 0,0025 3	4,93	3	6	3	1	4	3,45	0,6900	1,3800	0,6900	0,2300	0,9200
Total	18,03	13	14	18	6	5	3,11	0,7220	0,7775	0,9996	0,3332	0,2777
I 0,005 1	6,90	13	7	16	5	2	6,23	1,8835	1,0142	2,3181	0,7244	0,2898
I 0,005 2	9,32	10	13	23	4	4	5,79	1,0722	1,3939	2,4661	0,4289	0,4289
I 0,005 3	5,38	12	7	8	2	2	5,76	2,2297	1,2006	1,4865	0,3716	0,3716
Total	21,60	35	27	47	11	8	5,93	1,6215	1,2509	2,1774	0,5096	0,3706
I 0,01 1	9,43	10	15	16	2	0	4,56	1,0605	1,5907	1,6967	0,2121	0
I 0,01 2	6,98	10	16	13	0	0	5,59	1,4333	2,2933	1,8633	0	0
I 0,01 3	3,40	4	8	8	1	4	7,35	1,1760	2,3520	2,3520	0,2940	1,1760
Total	19,81	24	39	37	3	4	5,40	1,2112	1,9682	1,8673	0,1514	0,2019

Tabela 10. Análise das diferenças na frequência de mutação entre os grupos de revertentes, nos diversos tratamentos.

		A x B	A x B	B x C	A x B x C
CONTROLES	C _{DES}	7,00	0,89	3,13	11,73
	C _{INT}	0,25	0,08	0,60	4,08
	C _{HCl}	0	0	0	0
TRATAMENTOS	DES	2,98	74,00	48,67	74,99**
	I 0,0025	0,04	0,81	0,50	0,93
	I 0,005	1,03	1,76	5,41	5,58
	I 0,01	3,57	2,77	0,05	3,98

** Significância ao nível de 0,001.

Tabela 11. Análise do aumento da frequência de mutação provocada pelo tratamento com DES e HCl.

	DES	HCl
C _{DES}	679,51	-
C _{INT}	-	0,598

Tabela 12. Análise do aumento da frequência de mutação provocada pelo tratamento com três concentrações de integerrimina.

	I 0,0025	I 0,005	I 0,001
C _{INT}	8,78	49,43**	47,40**

Tabela 13. Análise do efeito de dose da integerrimina.

	I 0,0025	I 0,005
I 0,005	17,38**	-
I 0,01	-	0

** Significância ao nível de 0,001.

No grupo da integerrimina, houve os seguintes resultados:

1. incremento na taxa de mutação (Tabela 12);
2. efeito de dose, de forma que o pico do efeito mutagênico ficou por conta da concentração 0,005M (Tabela 13);
3. os tipos de supressores sofreram diferentes alterações, ou seja: na concentração de 0,0025M nota-se o aumento preferencial de C, embora não significativo; na concentração de 0,005M, esse aumento é significativo apenas ao nível de 2%, e na concentração de 0,01M houve um incremento de A e B que neutralizou essa diferença voltando ao comportamento de especificidade entre grupos de supressores, típico dos controles (Tabela 10).

No grupo de placas para cálculo de viabilidade, temos meio mínimo mais biotina mais metionina. Nelas crescem tanto auxotróficos como revertentes com a mesma morfologia selvagem. Em algumas placas, no entanto, apareceram mutantes que se comportaram como se estivessem em meio sem metionina, ou seja, apresentando a morfologia de um dos tipos de revertentes das placas de meio mínimo mais biotina.

4 DISCUSSÃO

Quando trabalhamos com o sistema metionina, é muito importante a perfeita distinção entre os diversos tipos morfológicos, por dois motivos:

1. A maioria dos trabalhos conta apenas com uma parte dos mutantes, pois segue a classificação de Lilly e, para efeito de comparação, o mesmo critério precisa ser seguido.
2. Se queremos analisar mais que o simples incremento de frequência de reversão, nossos dados devem ser arranjados em diferentes grupos morfológicos. Dessa maneira o número de genes analisados de cada vez é menor e, não agrupando caracteres independentes, teremos uma visão mais real dos eventos mutacionais.

O nosso objetivo é avaliar o possível efeito mutagênico da integerrimina, em termos de quantidade e, grosseiramente, de qualidade, observando a existência ou não de especificidade *interloci*, e, num segundo passo, fazer a comparação entre os dados de Alderson e Clark (1966), com lasiocarpina e heliotrina, e os nossos com integerrimina. Por esse motivo, seguimos todos os passos sugeridos por esses autores, na parte técnica do experimento, bem como o

critério de classificação dos resultados e análise estatística dos mesmos.

Parece-nos, no entanto, que o sistema proposto por Lilly (1965) parte do princípio de que apenas os *loci* envolvidos na determinação dos tipos morfológicos A, B e C são relevantes quando da ação de mutagênicos. É verdade que nos experimentos realizados até aqui o número de mutantes que fogem a esta classificação realmente não chega sequer a interferir significativamente na frequência total de mutação; impossível seria, pois, que mostrassem algum efeito visível como classes à parte. Mas isso não exclui a possibilidade de que novos mutagênicos em teste venham a atuar preferencialmente nesses *loci*. Nesse momento, não teremos um consenso na frequência de mutação espontânea para eles, ou maiores informações, bioquímica e geneticamente, sobre os seus supressores.

Buscando outra classificação que nos resolvesse esse aspecto, encontramos a proposta por Gajewski e Litwinska (1968), onde os tipos A e C de Lilly se agrupam no tipo 1; o tipo B, no 2; o tipo 3 é constituído por colônias pequenas, compactas e brancas, e no tipo 4 agregam-se todas as outras que não se enquadram nos tipos anteriores. O agrupamento dos tipos A e C é justificado pelos autores e pelos demais pesquisadores que adotaram essa classificação (Putrament *et al.*, 1970) pela dificuldade que se apresenta, muitas vezes, em distinguir os tipos A e C. Esse trabalho mostra experimentos em que o grupo 3 é altamente representado, o que corrobora nosso argumento do parágrafo anterior. Essa junção, no entanto, nos parece

mais grosseira ainda que a omissão feita na primeira classificação. Esses dois tipos já são reconhecidamente independentes e devidos a pelo menos dois *loci* cada um, desde Lilly (1965). Ambos são altamente relevantes nas análises. Notem-se o trabalho de Alderson e Clark (1966) e os nossos próprios resultados, onde o tipo C é o mais conclusivo de todos. Por outro lado, embora a coloração de ambos seja a mesma, o tamanho das colônias e sua forma tornam-nas inconfundíveis na quase totalidade dos casos (as do tipo A são bem maiores que as C, são ralas e apresentam bordos irregulares e esporulação também de aspecto irregular; as do tipo C são compactas, muito regulares, circulares mesmo, formando uma espécie de núcleo verde, circular e concêntrico, além do bordo hialino característico, que é ausente em A). As pouquíssimas exceções podem, essas sim, ser agrupadas no tipo 4 ou constituir um grupo à parte, pois seu número não vai dar peso a nível de significância, a um ou outro grupo.

Tendo em vista atender aos dois aspectos levantados, sugerimos uma nova classificação, que nada mais é que a junção das duas outras. Assim, os tipos A, B e C são os de Lilly, os outros (D e E) são os 3 e 4 de Gajewski e Litwinska, respectivamente. Como no nosso experimento estes dois últimos grupos de supressores não foram significativamente representados, preferimos fazer toda a análise dos resultados agrupando-os segundo Lilly.

As colônias tipo "pseudo B" (Alderson & Clark, 1966; Scott *et al.*, 1982) são colônias tipicamente B, marrons, mas com conídios verdes, como os de A. Ao serem repicadas, mostram o fenótipo A. Alderson e Clark (1966) agrupou-as

com A. No nosso experimento da integerrimina, bem como nos controles, elas foram tão raras quanto as do tipo D. Na parte do tratamento com DES, no entanto, eram a maioria entre as B. Não seguimos o procedimento de Alderson e Clark porque o questionamos. Ora, essas colônias são originalmente B, quer no tipo de micélio e forma de colônia, quer pela presença do pigmento marrom que as caracteriza inconfundivelmente. Sabe-se que elas são parcamente esporuladas e que Lilly não conseguiu obter cruzamento seja entre elas mesmas, seja entre elas e qualquer outro tipo. Portanto, essa esporulação verde abundante está em completo desacordo com a sua descrição. Ou houve uma "degeneração" qualquer, a partir de um certo estágio de crescimento, ou houve um crescimento de colônia A sobreposto ao micélio de B por constituir-se meio favorável.

De qualquer maneira, elas são peculiares, pois seu aparecimento pode ser induzido pelo DES, de forma que o que nos parece mais exato é colocá-las num grupo à parte, como um subgrupo de B, pois não há dúvida de que a mutação espontânea ou induzida foi no *locus* que participa do grupo de supressores de B, ou seja, se houve qualquer fenômeno capaz de transformá-la em A, o fenômeno mutacional foi em B.

Um aspecto interessante nos diversos grupos morfológicos é a relação entre a densidade do micélio e o crescimento radial da colônia, sem dúvida um aspecto importante ao se analisarem mutantes ainda pouco conhecidos. Bainbridge e Trinci (1969) fizeram referência à relação entre esses dois parâmetros na linhagem BWB224 e seu mutante BWB480, em *Aspergillus nidulans*.

As diferenças morfológicas aparecem quando os respectivos revertentes encontram-se em ausência de metionina. Nas placas com metionina, todas as colônias apresentam fenótipo selvagem (verde). Apesar disso, encontramos algumas exceções, ou seja, nas placas com metionina, certos mutantes comportam-se como se não estivessem em presença de metionina, apresentando características morfológicas do seu grupo, na maioria do tipo B e tipo D. Pieniazek *et al.* (1973) referem-se à existência da metionina permease como a primeira enzima envolvida no catabolismo da metionina. Posteriormente, Stepien (1976) realizou a purificação de uma proteína encontrada em *Aspergillus nidulans*, uma aminoácido permease neutra, cuja função é o transporte de metionina para a célula. Nesse mesmo trabalho, ele relata a existência de um mutante para essa permease, o nap 3A, incapaz de realizar o transporte de metionina e outros aminoácidos neutros. Parece-nos possível que os mutantes morfológicos que obtivemos em presença de metionina sejam mutantes também para a metionina-permease, de maneira que, realmente, não podem utilizar-se da metionina presente no meio, manifestando, então, o gene supressor, passando a sintetizar metionina.

Todos os trabalhos que têm empregado o sistema metionina para detecção de atividade mutagênica de agentes físicos e químicos apontam a mesma origem de sua linhagem: o Departamento de Genética de Glasgow. No entanto, os resultados referentes à reversão espontânea total e *interloci* são pronunciadamente díspares. Os dados de Siddiqi (1962) mostram uma frequência de mutação espontânea da ordem de

$8,2 \times 10^{-6}$, com uma distribuição entre os três tipos de 34,2%, 31,2% e 35% para A, B e C, respectivamente. Lilly (1965) relata uma frequência de $1/6 \times 10^{-4}$, aproximadamente 10×10^{-6} (66% A, 31% B e 3% C). Roper obteve 10×10^{-6} (Alderson & Clark, 1966), enquanto Alderson e Clark (1966), com o mesmo estoque, observaram $9,2 \times 10^{-6}$, sendo 35% A, 65% B e 0 C. Alderson e Clark, num outro experimento, encontraram uma frequência igual a $1,1 \times 10^{-6}$ (63% A, 29% B e 8% C). Duarte (1972) menciona em seu experimento $12,6 \times 10^{-6}$ (58% A, 31% B e 11% C) e Scott *et al.* (1973), de 2 a 5×10^{-6} . Esses dados estão na Tabela 14.

Segundo Klimczuk (1970), embora usando uma linhagem biA1 methG1 com mais uma marca (paba 23), o que lhe confere maior susceptibilidade à mutação ($28,8 \times 10^{-6}$), a frequência relativa de mutantes para os três tipos de supressores da metionina é consistente com os outros trabalhos (37% A, 52% B e 11% C). Ainda nesse trabalho, Klimczuk testou o possível acúmulo de reversões espontâneas e sua eventual vantagem nos estoques da linhagem biA1 methG1, que pudesse explicar, em parte, essa disparidade de resultados; verificou, no entanto, que tal fenômeno não ocorre.

No presente trabalho, os resultados levaram a uma frequência de mutação espontânea que variou de 6,4 a $20,4 \times 10^{-6}$. Na soma dos controles de DES a frequência foi de $19,2 \times 10^{-6}$, com 18% A, 54% B e 28% C, e na dos controles da integerrimina, $11,6 \times 10^{-6}$, com 31% A, 41% B e 27% C. Em ambos, a classe mais representada foi a B; as outras duas estiveram próximas, sendo que para os controles do DES esses números tiveram uma significância que ficou entre 0,001 e 0,1.

Tabela 14. Frequência de mutação espontânea e frequência relativa dos três tipos de mutantes para o sistema metionina, com linhagem biA1 methG1.

AUTORES	FREQUÊNCIA DE MUTAÇÃO ESPONTÂNEA	FREQUÊNCIA RELATIVA DE MUTANTES (%)		
		A	B	C
SIDDIQI (1962)	$8,2 \times 10^{-6}$	34	31	35
LILLY (1965)	10×10^{-6}	66	31	3
ROPER (ALDERSON & CLARK, 1966)	10×10^{-6}			
ALDERSON & CLARK (1966) (com estoque de ROPER)	$9,2 \times 10^{-6}$	35	65	0
ALDERSON & CLARK (1966)	$1,1 \times 10^{-6}$	63	29	8
DUARTE (1972)	$12,6 \times 10^{-6}$	58	31	11
SCOTT <i>et al.</i> (1973)	$2-5 \times 10^{-6}$			

No controle do ácido clorídrico, as três classes estiveram absolutamente iguais, com uma frequência de reversão espontânea de $9,2 \times 10^{-6}$.

Embora esses dados estejam dentro dos limites de variação apresentados por outros autores, parece-nos haver um único empecilho para que os resultados sejam mais conclusivos. As amostras foram pequenas: baixa densidade de conídios por placa e poucas placas por tratamento. Segundo Scott *et al.* (1973), essa densidade pode chegar até 20 revertentes por placa, a partir do que pode haver interferência no aparecimento de prototróficos, e a média deste trabalho foi de 2,8 para o bloco da integerrimina e 19 para o do DES. Assim, para um número de conídios viáveis da ordem de $4,00 \times 10^5$, dando uma sobrevivência de 60% após o tratamento com DES, o número de conídios semeados por placa deve ser $2,29 \times 10^5$, ou seja, na suspensão de esporos submetida a tratamento deve haver $22,86 \times 10^5$ conídios/ml. Em relação à integerrimina, considerando os resultados obtidos, para um número de conídios viáveis de $6,5 \times 10^5$, devem semear-se cerca de 10^6 conídios por placa, ou seja, 0,1ml de uma suspensão submetida a tratamento com 10^7 conídios/ml.

De qualquer maneira, a consistência dos dados nas três repetições de todos os grupos mostra que pelo menos o aspecto técnico dos experimentos foi muito bom.

Assim, com nossos dados, podemos afirmar que o dietil sulfato diminui a viabilidade (em torno de 40%), embora Alderson e Clark (1966) tenham obtido uma sobrevivência de apenas 0,5% com a mesma concentração e com o mesmo tempo de tratamento. No entanto, seus dados apresentam um nível de

heterogeneidade que torna difícil a comparação dos nossos dados com os deles. O aumento da frequência de mutação foi significativo, mostrando que, apesar da queda de viabilidade apresentada pela nossa amostra, o efeito mutagênico foi perfeitamente verificado. Um resultado, no entanto, que ficou claro, foi a diferença de especificidade intergênica do DES entre os dados de Alderson e Clark (1966), onde houve um incremento significativo de A (76,6%) em menor proporção de B (20,3%) e menor ainda de C (3,1%), e o presente trabalho, em que obtivemos um aumento semelhante de A e B (45% e 38%, respectivamente) e, embora pequeno, de C (17%).

A integerrimina mostrou não alterar a viabilidade do material em nenhuma das concentrações utilizadas. No entanto, aumentou significativamente a frequência de mutação na concentração de 0,005M, marcadamente do tipo C (43%), o que não aconteceu com os alcalóides pirrolizidínicos testados por Alderson e Clark (1966), onde o aumento foi 85% em A (para heliotrina) e 78% em B (para lasiocarpina). Já com dose de 0,01M não houve um aumento, apenas um incremento proporcional de A e B, de forma que desapareceu a diferença entre os três tipos de supressores.

A concentração de 0,0025M não foi significativamente eficiente como mutagênica, embora aumentasse o aparecimento de mutantes.

Esses dados eram inesperados para nós, pois há um consenso a respeito de dois pontos principais:

1. A toxicidade e a mutagenicidade dos alcalóides pirrolizidínicos devem-se à sua metabolização em derivados

pirrólicos por diferentes caminhos enzimáticos no fígado, razão por que, nos animais intoxicados natural ou experimentalmente, as maiores lesões estão nesse órgão (Mattocks, 1969; Mattocks, 1971).

2. Os fungos e bactérias não podem fazer essa espécie de metatolização porque não possuem essas enzimas. Green e Muriel (1975) descrevem o uso de microsossomos hepáticos em cultura de *E. coli* que permitem essa metabolização e conseqüente efeito tóxico e mutagênico. Culvenor *et al.* (1969) cita um trabalho seu não publicado, onde a exposição de *Aspergillus* a dehidroheliotrina e dehidrolasiocarpina (alcalóides já metabolizados) redundou em efeito mutagênico. Outros autores mencionam, no entanto, sugestões de outros pesquisadores, segundo as quais os alcalóides pirrolizidínicos na planta têm efeito bacteriostático e fungistático (Ramos, 1977; Ramos & Marques, 1978).

A integerrimina foi testada por Ramos (1977) em *Drosophila*, quanto a efeito mutagênico através do aparecimento de letais recessivos. Seus resultados foram positivos, aparecendo um efeito de dose entre 0,0025M e 0,005M, e entre 0,005M e 0,01M, tal como no nosso caso, sendo o efeito máximo encontrado com a concentração de 0,005M para uma linhagem, enquanto a outra ainda respondeu à dose de 0,1M.

Essa consistência de resultados, embora os organismos-teste sejam diferentes, sugere-nos que a integerrimina está realmente atuando como mutagênica, embora não metabolizada em seus derivados pirrólicos. É possível, pois, que ela possa atuar a partir de outro tipo de reações, assumindo seu

papel de alquilante na célula, sem o concurso das enzimas hepáticas.

Clark (1959) e Cook e Holt (1966), testando a relação entre doses de alcalóides e a porcentagem de letais recessivos ligados ao sexo, em *D. melanogaster*, trabalhando com heliotrina e monocrotalina, respectivamente, não encontraram incremento significativo no efeito em relação ao aumento da dose quando esta era elevada.

Downing e Peterson (1968), estudando o efeito de diferentes doses de alcalóides pirrolizidínicos hepato-tóxicos em relação ao grau de inibição da mitose de células de fígado de rato, observaram proporcionalidade em todos eles até que as concentrações se fossem tornando elevadas, quando a resposta adicional passava a ser pequena em relação ao aumento da dose.

Fahmy e Fahmy (1961) observaram que compostos muito tóxicos apresentavam, em altas concentrações, uma taxa de mutação mais baixa que a esperada (admitindo-se que a linearidade da relação se mantivesse com essas concentrações) pela eliminação seletiva das células mais sensíveis à mutação.

Isso poderia estar ocorrendo no nosso experimento, na concentração de 0,01M de maneira a nem sequer alterar a viabilidade.

Não resta dúvida, no entanto, que o presente trabalho abre caminho para novos ensaios, na busca de compreensão dos mecanismos de ação dos alcalóides pirrolizidínicos como tóxicos, antimitóticos e mutagênicos.

5 RESUMO E CONCLUSÕES

O alcalóide pirrolizidínico integerrimina extraído de *Senecio brasiliensis* Less. var. *tripartitus* e o alquilante monofuncional dietil sulfato (DES) foram testados quanto ao potencial mutagênico no sistema metionina em *Aspergillus nidulans*.

Para isso foi usada linhagem biA1 methG1 de *Aspergillus nidulans*, dietil sulfato na concentração de 0,05M por 30 minutos e integerrimina nas três concentrações a saber: 0,0025M, 0,005M e 0,01M, durante 24 horas. Para efeito de controle, uma vez que a integerrimina é apenas solúvel em HCl 0,1N, testaram-se também os possíveis efeitos desse solvente, na mesma concentração que a usada com a integerrimina, ou seja, 20%.

Os resultados obtidos mostraram que:

1. o DES aumenta a frequência de mutação, incrementando preferencialmente o aparecimento dos tipos A e B de revertentes e significativamente menos do tipo C;

2. a integerrimina é mutagênica em *Aspergillus nidulans*, embora não haja nesse microorganismo enzimas para sua metabolização a derivados pirrólicos;

3. há efeito de dose: a concentração de 0,0025M atuou não significativamente, enquanto que a de 0,005M foi

significativa, com um incremento preferencial de C, onde se distinguiu um platô do efeito mutagênico, não havendo, portanto, aumento adicional significativo na frequência de reversão provocada pela concentração de 0,01M;

4. a frequência de mutação espontânea variou de 6,4 a 20×10^{-6} .

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. & DUUREN, B.L. Usaramoensine, the alkaloid in *Crotalaria usaramoensis* E.G. Baker. Integerrimine from *Crotalaria incana* Linn and senecionine from *Senecio glabellus* D.C. Stereochemical relationships. *J.Am.Chem. Soc.*, 75:4631-4635, 1953.
- ALDERSON, T. & CLARK, A.M. Interlocus specificity for chemical mutagens in *Aspergillus nidulans*. *Nature*, 210: 593-595, 1966.
- ASADA, Y.; FURUYA, T.; MURAKAMI, N. Pyrrolizidine alkaloids from *Ligularia japonica*. *Planta Med.*, 42:202-203, 1981.
- AYLING, P.D. Methionine suppressors in *Aspergillus nidulans*: their genetics and behaviour in heterocaryons and diploids. *Genet.Res.*, 14:275-289, 1969.
- BAINBRIDGE, B.W. & TRINCI, A.P.J. Colony and specific growth rates of normal and mutant strains of *Aspergillus nidulans* *Trans.Br.Mycol.Soc.*, 53:473-475, 1969.
- BALL, C. & ROPER, J.A. Studies on the inhibition and mutation of *Aspergillus nidulans* by acridines. *Genet.Res.*, 7:207-221, 1966. Apud Clutterbuck, 1975.
- BARGER, G. & BLACKIE, J.J. Alkaloids of *Senecio*. Senecionine and squalidine. *J.Chem.Soc.*: 743-745, 1936.
- BENZER, S. & CHAMPE, S.P. A change from nonsense to sense in the genetic code. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 48:1114-1121, 1962.
- BLACK, D.N. & JAGO, M.V. Interaction of dehidroheliotridine, a metabolite of heliotridine-based pyrrolizidine alkaloids, with native and heat-denatured deoxyribonucleic acid *in vitro*. *Biochem.J.*, 118:347-353, 1970.
- BRINK, N.G. The effect of cyanide and azide on the mutagenic activity of pyrrolizidine alkaloid heliotrine on *Drosophila melanogaster*. *Zeitschrift für Vererbungslehre*, 94: 331-335, 1963.
- BRISKE, D.D. & CAMP, B.J. Water stress increases alkaloid concentrations in threadleaf groundsel (*S. longilobus*). *Weed Sci.*, 30:106-108, 1981.
- CHANG, L.T.; LENNOX, J.E. & TUVESON, R.W. Induced mutation in UV-sensitive mutants of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Mutat.Res.*, 5:217-224. Apud Clutterbuck, 1975.

- CHOPRA, R.N. Indigenous drugs of India. *Calcutta* (The Art Press). 1933. Apud SCHOENTAL & HEAD, 1955.
- CLARK, A.M. Mutagenic activity of the alkaloid heliotrine in *Drosophila*. *Nature*, 183:731-732, 1959.
- CLUTTERBUCK, A.J. *Aspergillus nidulans*. In KING, R.C. (ed.), *Handbook of Genetics*. Vol. I. New York, Plenum. 1975. p.447-510.
- COOK, L.M. & HOLT, A.C.E. Mutagenic activity in *Drosophila* of two pyrrolizidine alkaloids. *J.Genet.*, 59:273-274, 1966. Apud RAMOS, 1977.
- CULVENOR, C.C.J.; DANN, A.T.; DICK, A.T. Alkylation as the mechanism by which the hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids act on cell nuclei. *Nature*, 195:570-573, 1962.
- CULVENOR, C.C.J. Tumor-inhibitory activity of pyrrolizidine alkaloids. *J.Pharm.Sci.*, 57:1112-1117, 1968.
- CULVENOR, C.C.J.; DOWNING, D.T.; EDGAR, J.A.; JAGO, M.V. Pyrrolizidine alkaloids as alkylating and antimitotic agents. *Ann.New York Acad. Sci.*, 163:837-847, 1969.
- DALCHE, R. & HEIM, F. *Ther.Mh.*, 275, 1897. Apud KLÁSEK, 1973.
- DEBSKA, W.; OWCZARSKA, A.; MADALINSKA, R. Investigations of *Radix symphyti* of lasiocarpine content. *Herba Pol.*, 26: 47-52, 1980.
- DEINZER, M.L.; THOMSON, P.A.; BURGETT, D.M.; ISAACSON, D.L. Pyrrolizidine alkaloids: their occurrence in honey from Tansy Ragwort (*Senecio jacobaea*). *Science*, 195:497-499, 1977.
- DOWNING, D.T. & PETERSON, J.E. Quantitative assessment of the persistent antimitotic effect of certain hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids on rat liver. *Aust.J.Exp.Biol. Med.Sci.*, 46:493-502, 1968.
- DUARTE, F.A.M. Efeitos mutagênicos de alguns ésteres de ácidos inorgânicos em *Aspergillus nidulans* winter. *Ciên. Cult.*, 24:42-52, 1972.
- FAHMY, O.G. & FAHMY, M.J. Cytogenetic analysis of the action of carcinogens and tumour inhibitors in *Drosophila melanogaster*. XI. Mutagenic efficiency of the mesyloxy esters on the sperm in relation to molecular structure. *Genetics*, 46:1111-1123, 1961.
- FORBES, E. Use of mitotic segregation for assigning genes to linkage groups in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 13: 67-80, 1959.
- GAJEWSKI, W. & LITWINSKA, J. Methionine loci and their suppressors in *Aspergillus nidulans*. *Mol.Gene.Genet.*, 102: 210-220, 1968.
- GARRET, B.J.; CHEEKE, P.R.; MIRANDA, C.L.; GOEGER, D.E.; BUHLER, D.R. Consumption of poisonous plants (*S. jacobaea*, *Symphytum officinale*, *Pteridium aquilinum*, *Hypericum perforatum*) by rats: Chronic toxicity, mineral metabolism and hepatic drug-metabolizing enzymes. *Toxicol.Lett*, 10: 183-188, 1982.

- GOEGER, E.D.; CHEEKE, P.R.; SCHMITZ, J.A.; BUHLER, D.R.
Toxicity of tansy ragwort (*Senecio jacobaea*) to goats. *Am. J. Vet. Res.*, 43:252-254, 1981.
- GOMES, C.M.R. & GOTTLIEB, O.B. Sistemática de plantas alcaloidíferas. *Ciênc. Cult.*, 32:62-64, 1978.
- GONZÁLEZ, E.G. & CALERO, A. Squalidine and integerrimine. *Chem. & Ind.*, London, 126, 1958.
- GREEN, M.H.L. & MURIEL, W.J. Use of repair-deficient strains of *E. coli* and liver microsomes to detect and characterise DNA damage caused by the pyrrolizidine alkaloids heliotrine and monocrotaline. *Mutat. Res.*, 28:331-336, 1975.
- HILL, K.R. Discussion on seneciosis in man and animals. *Proc. Royal Soc. Med.*, 53:281-283, 1960.
- JANZEN, D.H. *Chemistry in evolution and systematics*. (SWAIN, T., ed.). New York, Russak, 1973. p.529. *Apud* LEVIN & YORK, 1978.
- JOHNSON, A.E. Failure of mineral-vitamin supplements to prevent tansy ragwort (*Senecio jacobaea*) toxicosis in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 43:718-723, 1982.
- KÄFER, E. An eight-chromosome map of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.*, 9:105-145, 1958.
- KIM, H.L. & JONES, L.P. Protective effects of butylated hydroxyanisole, ethoxyquin and disulfiram on acute pyrrolizidine alkaloids poisoning in mice. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 36:341-344, 1982.
- KLÁSEK, A. The investigation of pyrrolizidine alkaloids at the Institute of Chemistry of the Medical Faculty, Palacký University in Olomouc. *Acta Univ. Palackianae Olomucensis-Facultatis Med.*, 65:33-50, 1973.
- KLIMCZUK, J. Spontaneous and induced reversions of meth 1 mutant of *Aspergillus nidulans*. *Genet. Pol.*, 11:313-319, 1970.
- KROPMAN, M. & WARREN, F.L. The *Senecio* alkaloids. The isomerization of senecic acid to trans-senecic (integerrimic) acid, and the general structure of the "necic" acids. *J. Chem. Soc.*, 700-702, 1950.
- KUHARA, K.; TAKANASHI, H.; HIRONO, I.; FURUYA, T.; ASADA, Y. Carcinogenic activity of clivorine, a pyrrolizidine alkaloid isolated from *Liguria dentata*. *Cancer Lett.*, 10:117-122, 1980.
- KUPCHAN, S.M.; DOSKOTCH, R.W.; VANEVENHOVEN, P.W. Tumour inhibitors. III. Monocrotaline the active principle of *Crotalaria spectabilis*. *J. Pharm. Sci.*, 53:343-345, 1964.
- LEVIN, D.A. & YORK Jr., B.M. The toxicity of plant alkaloids: an ecogeographic perspective. *Biochem. Syst. Ecol.*, 6:61-76, 1978.
- LILLY, L.J. An investigation of suitability of the suppressors of meth, in *A. nidulans* for the study of induced an spontaneous mutation. *Mutat. Res.*, 2:192-195, 1965.

- MANSKE, R.H.F. The alkaloids of *Senecio* species. III. *Senecio integerrimus*, *S. longilobus*, *S. spartioides* and *S. ridellii*. *Can.J.Res.*, 17B:1-7, 1939.
- MARTIN, P.A.; THORBURN, M.J.; HUTCHINSON, S.; BRAS, G.; MILLER, C.G. Preliminary findings of chromosomal studies on rats and humans with veno-occlusive disease. *Br.J.Exp. Path.*, 53:374-380, 1972.
- MATTOCKS, A.R. Dehidropyrrolizine derivatives from unsaturated pyrrolizidine alkaloids. *Journal of the Chemical Society (c)*:1155-1162, 1969.
- MATTOCKS, A.R. Toxicity and metabolism of *Senecio* alkaloids. In HARBORNE, J.B. (ed.), *Phytochemical ecology*. London and New York, Academic Press, 1972. p.179-200.
- MATTOCKS, A.R. & WHITE, I.N.H. The conversion of pyrrolizidine alkaloids to N-oxides and to dihydropyrrolizine derivatives by rat-liver microsomes *in vitro*. *Chemico-Biological Interactions*, 3:383-396, 1971.
- MCLEAN, E.K. The toxic actions of pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloids. *Pharmacol.Rev.*, 22:429-483, 1970.
- MIRANDA, C.L.; BUHLER, D.R.; RAMSDELL, H.S.; CHEEKE, P.R.; SCHMITZ, J.A. Modifications of chronic hepatotoxicity of pyrrolizidine (*Senecio jacobaea*) alkaloids by butylated hydroxyanisole and cysteine. *Toxicol.Lett.*, 10:177-182, 1982.
- MIRANDA, C.L.; CHEEKE, P.R.; BUHLER, D.R. Comparative effects of the pyrrolizidine alkaloids jacobine and monocrotaline on hepatic drug metabolizing enzymes in the rat. *Res.Comm. Chem.Pathol.Pharmacol.*, 29:573-587, 1980a.
- MIRANDA, C.L.; CHEEKE, P.R.; BUHLER, D.R. Effect of pyrrolizidine alkaloids from tansy ragwort (*S. jacobaea*) on hepatic drug-metabolizing enzymes in male rats. *Biochem. Pharmacol.*, 25:2645-2650, 1980b.
- MIRANDA, C.L.; CHEEKE, P.R.; SCHMITZ, J.A.; BUHLER, D.R. Toxicity of *Senecio jacobaea* (tansy ragwort) in rats. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 56:432-442, 1980.
- MIRANDA, C.L.; ENDERSON, M.C.; BUHLER, D.R. Dietary copper enhances the hepatotoxicity of *Senecio jacobaea* in rat. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 60:418-423, 1981.
- MORAES, E. de C.F. Contribuição ao estudo químico-toxicológico do *Senecio brasiliensis* Less. Tese de Livre Docência, Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de São Paulo. 1952. 90 p.
- MOTIDOME, M. & FERREIRA, P.C. Alcalóides do *Senecio brasiliensis* Less. *Rev.Fac.Farm.Bioquím.USP*, 4:13-44, 1966.
- MYERS, J.H. Is the insect or the plant the driving force in the cinnabar moth (*Tyria jacobaea*) and tansy ragwort (*Senecio jacobaea*) system? *Oecologia*, 47:16-21, 1980.
- NARDI, N.B.; GIMMLER, M.C.; LEITE, B.G. Antimitotic action of integerrimine in rats. *Rev.Brasil.Genet.*, 3:387-393, 1980.

- PASZEWSKI, A. & GRABSKI, J. Studies on β -cystathionase and O-acetylhomoserine sulphydrylase as the enzymes of alternative methionine biosynthetic pathways in *Aspergillus nidulans*. *Acta Biochim.Pol.*, 20:159-168, 1973.
- PASZEWSKI, A. & GRABSKI, J. Regulation of S-amino acids biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Mol.Gen.Genet.*, 132: 307-320, 1974.
- PASZEWSKI, A. & GRABSKI, J. Enzymatic lesions in methionine mutants of *Aspergillus nidulans*: role and regulation of an alternative pathway for cysteine and methionine synthesis. *J.Bacteriol.*, 124:893-904, 1975a.
- PASZEWSKI, A. & GRABSKI, J. Homolanthionine in fungi: accumulation in the methionine-requiring mutants of *Aspergillus nidulans*. *Acta Biochim.Pol.*, 22:263-267, 1975b.
- PETTIT, G.R.; EINCK, J.J.; BROWN, P.; HARVEY, T.B.; ODE, R.H.; PASE, C.P. Antineoplastic agents: 67. *Senecio fendleri*. *J.Nat.Prod.*, 43:609-616, 1980.
- PIENIAZEK, N.J.; STEPIEN, P.P.; PASZEWSKI, A. An *Aspergillus nidulans* mutant lacking cystathionine β -synthase: Identity of L-serine sulphydrylase with cystathionine β -synthase and its distinctness from O-acetyl-L-serine sulphydrylase. *Biochim.Biophys.Acta*, 297: 37-47, 1973.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MacDONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.*, 5:141-238, 1953.
- PRASAD, I. *Can.J.Microbiol.*, 16:369-372, 1970. Apud Scott *et al.*, 1982.
- PUKLAL'SKAYA, A.Ch.; PETROVA, M.F.; MAN'KO, I.V. Investigation of the action of six alkaloids derived from 1-methyl-pyrrolizidine on the grown of hepatoma and other transplanted animal tumours. *Byull.Eksp.Biol.Med.*, 48: 91-93, 1959.
- PUTRAMENT, A.; GUZEWSKA, J.; PIENIAZEK, D. Further characteristics of methionine mutants and their suppressors in *Aspergillus nidulans*. *Mol.Gen.Genet.*, 109:209-218, 1970.
- RAMOS, A.L.P. *Ação mutagênica de alcalóides do Senecio brasiliensis* Less var. *tripartitus*. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 1977. 74 p.
- RAMOS, A.L.P. & MARQUES, E.K. Ação tóxica e mutagênica de alcalóides do gênero *Senecio*. *Agronomia Sulriograndense*, 14:337-344, 1978.
- REDDY, J.; HARRIS, C.; SVOBODA, D. Inhibition by lasiocarpine of RNA polymerase and induction of tryptophan pyrrolase activity. *Nature*, 217:659-661, 1968.
- ROSE, E.F. *Senecio* species: toxic plants used as food and medicine in the Transkei. *S.Afr.Med.J.*, 46:1039-1043, 1972.

- SHARMA, R.P. Combined effect of physical and chemical mutagens on mutation frequency in *Aspergillus nidulans*. *Indian J. of Genetics and Plant Breeding*, 30:199-211, 1970.
- SCHNEIDER, D.; BOPPRE, M.; ZWEIG, J.; HORSLEY, S.B.; BELL, T.W.; MEINWALD, J. Scent organ development in *Cretonotos* moths: Regulation by pyrrolizidine alkaloids. *Science*, 215: 1264-1265, 1982.
- SCHOENTAL, R. & HEAD, M.A. Pathological changes in rats as a result of treatment with monocrotaline. *Br.J.Cancer*, 9: 229-237, 1955.
- SCHOENTAL, R.; HEAD, M.A.; PEACOCK, P.R. Senecio alkaloids. Primary liver tumours in rats. *Brit.J.Cancer*, 8:458-465, 1954. *Apud* MATTOCKS, 1972.
- SCOTT, B.R. & ALDERSON, T. The random (non-specific) forward mutational response of gene loci in *Aspergillus* conidia after photosensitisation to near ultraviolet light by 8-methoxypsoralen. *Mutat.Res.*, 12:29-34, 1971.
- SCOTT, B.R.; ALDERSON, T.; PAPWORTH, D.G. The effect of plating densities on the retrieval of methionine suppressor mutations after ultraviolet or gamma irradiation of *Aspergillus*. *J.Gen.Microbiol.*, 75:235-239, 1973.
- SCOTT, B.R.; DORN, G.L.; KÄFER, E.; STAFFORD, R. *Aspergillus nidulans*: Systems and results of tests for induction of mitotic segregation and mutation. II. Haploid assay systems and overall response of all systems. *Mutat.Res.*, 98:49-94, 1982.
- SIDDIQI, O.H. Mutagenic action of nitrous acid on *Aspergillus nidulans*. *Genet.Res.*, 3:303-314, 1962.
- STEPIEN, P.P. Partial purification of methionine binding protein from *Aspergillus nidulans* by affinity chromatography. *Biochim.Biophys.Acta*, 439:154-159, 1976.
- STYLES, J.; ASHBY, J.; MATTOCKS, A.R. Evaluation *in vitro* of several pyrrolizidine alkaloids carcinogens: observations on the essential pyrrolic nucleus. *Carcinogenesis*, 1:161-164, 1980.
- SULLMAN, S.F. & ZUCKERMAN, A.J. The effect of heliotrine, a pyrrolizidine alkaloid, on human liver cells in culture. *Br.J.Exp.Pathol.*, 50:361-370, 1969.
- WATT, J.M. & BREYER BRANDWIJK, M.G. The medicinal and poisonous plants of Southern Africa. Edinburg, R.S. Livingstone, 1932. *Apud* SCHOENTAL & HEAD, 1955.
- WHITE, I.N.H. & MATTOCKS, A.R. Reaction of dihydropyrrolizines with deoxyribonucleic acids *in vitro*. *Biochem. J.*, 128:291-297, 1972.
- WILLIAMS, G.M.; MORI, H.; HIRONO, I.; NAGAO, M. Genotoxicity of pyrrolizidine-alkaloids in the hepatocyte primary culture-DNA-repair test. *Mutat.Res.*, 79:1-6, 1980.
- WOHLRAB, G. & TUVESON, R.W. Effects of liquid holding on the induction of mutations in an ultraviolet-sensitive strain of *Aspergillus nidulans*. *Mut.Res.*, 8:265-275, 1969. *Apud* CLUTTERBUCK, 1975.

- YAMANAKA, H.; NAGAO, M.; SUGIMURA, T.; FURUYA, I.; SHIRAI, A.; MATSUSHIMA, T. Mutagenicity of pyrrolizidine alkaloid in the *Salmonella*/mamalian-microsome test. *Mutat.Res.*, 68: 211-216, 1979.
- YANOFSKY, C. & St. LAWRENCE, P. Gene action. *Annu.Rev. Microbiol.*, 14:311-340, 1960.